ISSN 0037-8437

# ANALES
## DE LA
# SOCIEDAD CIENTIFICA
# ARGENTINA

Director: Dr. EDUARDO A. CASTRO

AÑO 1997 - VOLUMEN 227 - NUMERO ESPECIAL

HOMENAJE AL

*Dr. Pedro Cattáneo*

## SUMARIO



Avda. SANTA FE 1145 • 1059 BUENOS AIRES • ARGENTINA
1997

ISSN 0037-8437

# ANALES
## DE LA
# SOCIEDAD CIENTIFICA
## ARGENTINA

Director: Dr. EDUARDO A. CASTRO
Secretario: DR. EDUARDO BOTTANI

AÑO 1997 - VOLUMEN 227 - NUMERO ESPECIAL




Avda. SANTA FE 1145 • 1059 BUENOS AIRES • ARGENTINA
1997



HOMENAJE AL

# Dr. Pedro Cattáneo

Recopilar la labor docente y académica de nuestro homenajeado con más de sesenta años de actividad permanente, no resulta una tarea sencilla para un biógrafo aficionado. Por ello, los datos que se presentarán han sido plagiados de escritos previos de otros colegas *(vide infra)* y de la lectura del CV del propio receptor de este homenaje.

Es seguro que esta recopilación tendrá carencias y errores por lo que desde ya pido disculpas al propio Dr. Cattáneo y a los lectores.

El joven Pedro Cattáneo obtuvo su título de Doctor en Química en 1937, pero ya desde 1931 trabajaba como ayudante de Química en los Laboratorios de Contralor de Alimentos (ex-Oficina Química Municipal). En 1935, siendo estudiante del Doctorado en Química, se desempeña también como Ayudante en la Cátedra de Bromatología y Análisis Industriales de la entonces Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Al obtener su título de Doctor, en su trabajo fuera de la Universidad, es ascendido a Jefe del Laboratorio de Investigaciones y Contralor de Métodos Analíticos en los mismos laboratorios de la ex-Oficina Química Municipal. En esta función se mantiene hasta 1950. Paralelamente, continuó desempeñándose como Ayudante en la Cátedra de Bromatología hasta 1940 cuando pasa a actuar como Jefe de Trabajos Prácticos en la cátedra de Química Orgánica de la misma Facultad. (Se supone que éste puede ser el único período de su actividad universitaria en que trabajó en temas no íntimamente relacionados con la Bromatología).

En 1943 retorna, como Profesor Interino, a la cátedra de Bromatología, en la que permanece sin interrupciones hasta poco tiempo atrás. Por supuesto, que durante ese largo lapso fue avanzando en su carrera docente ya que a partir de 1947 y hasta 1959 ocupa el cargo de Profesor Titular y desde 1960 hasta 1978 actúa como Profesor Titular Plenario, con dedicación ex-

clusiva. En 1978, cuando alcanza la edad de jubilación es designado Profesor Extraordinario de la UBA con categoría de Emérito.

Retrocediento en el tiempo, en su carrera fuera de la Universidad, lo habíamos dejado, en 1950, como Jefe del Laboratorio de Investigaciones y Contralor de Métodos Analíticos. A partir de ese año pasa a desempeñarse en la Dirección Nacional de Química, que dependía del Ministerio de Hacienda, como Químico Investigador y al año siguiente, 1951, es nombrado Jefe del Laboratorio de Investigaciones sobre Grasas y Aceites, ese cargo lo conserva hasta 1955.

En ese año lo designan Director Nacional de Química, cargo que mantiene hasta 1959. Como ya se comentó, a partir de 1960 acepta condiciones de dedicación exclusiva en la ahora Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la UBA.

Por supuesto que también tenía actividades fuera de la Universidad ya que colabora estrechamente con varias instituciones como la Asociación Argentina para el progreso de las Ciencias (AAPC), la Asociación Química Argentina (AQA) y la Sociedad Científica Argentina, así, en la AAPC se desempeña como Secretario desde 1945 a 1955 y como Tesorero entre 1950 y 1963. En la AQA actúa como bibliotecario entre 1942 y 1945, como Secretario de Redacción de los Anales de AQA entre 1947 y 1953, como Director de la misma Revista entre 1954 y 1960, y desde entonces, como Miembro de su Comité Asesor.

Dentro del ambiente universitario es también requerido para realizar tareas afines como en 1967 es Vice-Decano de la FCEyN, UBA.

En 1969, por razones reglamentarias, el Dr. Venancio Deulofeu tiene que dejar su cargo de Director del Departamento de Química Orgánica y lo sucede el Dr. Cattáneo quien ocupa la citada Dirección hasta 1972; en esa condición y desde 1971 hasta 1973 se desempeña como miembro del Consejo Académico de la FCEyN. Aclaremos que desde 1959 no vuelve a ocupar cargos rentados fuera del ámbito universitario.

Retomando el hilo, merece destacarse que el Dr. Cattáneo había sido invitado por el propio Dr. Bernardo Houssay a incorporarse a la Carrera del Investigador Científico del CONICET, pero no había aceptado por su condición de Profesor Titular con dedicación exclusiva o quizás imitando el proceder del Dr. Deulofeu, quien era contrario a la idea que a la Carrera del Investigador se incorporaran profesionales mayores ya formados.

Pero en 1977, y quizás previendo que al año siguiente debería acogerse a la jubilación en su carrera de docente universitario, aceptó un nuevo ofrecimiento y se incorporó a la Carrera del Investigador Científico del CONICET con categoría de Investigador Superior.

En esas condiciones (son especulaciones personales) podía acogerse a la jubilación y seguir disponiendo de una herramienta oficial habilitante para poder continuar en la Facultad con sus investigaciones. Como ya lo indiqué, al llegar a su jubilación el Dr. Cattáneo fue designado Profesor Emérito, pero en muchas Facultades, como en la FCEyN, ese cargo no representa remuneración material alguna ni garantiza lugar de trabajo. En calidad de Investigador Superior del CONICET, obtenía las dos cosas y podía gozar tranquilo de su cargo honorario de Profesor Emérito.

Volviendo un poco atrás, a partir de 1960 su quehacer extrauniversitario estuvo principalmente ligado al CONICET y a la Sociedad Científica Argentina, con actuaciones en las restantes corporaciones a las que pertenece.

En el CONICET, creado en 1956, actúa casi permanentemente durante más de 20 años; así entre 1960 y 1967 se desempeña como Miembro de la Junta de Calificación y Promoción de la Carrera del Investigador, entre 1967 y 1983 es Miembro de la Comisión de Ciencias Químicas, actuando en varios ejercicios como Presidente o Vicepresidente de la misma y es además Miembro de la Junta de Calificación y Promoción; también en 1972-73 actúa como Miembro del Directorio y Miembro del Comité Ejecutivo.

Durante el período 1983-1988, las autoridades del CONICET no requirieron de sus consejos, pero a partir de 1989 vuelve a formar parte de la citada Comisión de Química y a partir de

1991 es llamado a integrar una de las nuevas Comisiones Asesoras de Unidades Funcionales (CASAUF).

Es de destacar también que en 1989 es designado Miembro del Consejo Asesor Científico y Tecnológico de la SECYT.

En la Sociedad Científica Argentina, a la que pertenece desde 1952, actuó como Vicepresidente entre 1956-1958 y desde ese entonces es Miembro del Consejo Científico. En 1977 se desempeñó como Miembro de la Junta Directiva y desde ese mismo año hasta corto tiempo atrás fue Director de los Anales de esa Sociedad.

El Dr. Cattáneo es el decano de los Miembros Titulares de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales a la que fuera incorporado en 1957. En 1987 es designado Miembro Correspondiente de la Academia Chilena de Ciencias y siguió coleccionando posiciones académicas ya que en 1989 es invitado a ocupar un sillón titular en la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, y en 1991 ocurrió lo propio en la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.

En cuanto a los premios y distinciones recibidas mencionaré el "Guillermo Rawson" cuando aún era estudiante, el premio Abraham Mibashan (CONICET, 1963), el premio Fundación Boris Garfunkel e Hijos (CONICET, 1969), el premio Shell Argentina (CONICET, 1970), el Dr. J. J. Kyle (máximo premio de la Asociación Química Argentina, 1972), el Laurel de Plata (Ateneo Rotario del Rotary Club de Buenos Aires, 1976), el Diploma de Honor (Fundación Pedro Escudero, 1981) y el cargo de Profesor Extraordinario Honorario de la Universidad Nacional de Río Cuarto (1985). También la Universidad de Buenos Aires lo honró en 1985 designándolo Profesor Honorario. Recibió de manos del Presidente de la Nación la Medalla de Investigador Emérito del CONICET.

Dadas su capacidad de trabajo y su destacable formación científica el Dr. Cattáneo fue llamado a intervenir en un gran número de otras comisiones, juntas, consejos directivos y jurados; también como delegado de instituciones nacionales en numerosas reuniones nacionales e internacionales vinculadas a los temas por los cuales es internacionalmente conocido, y es además socio honorario de varias Sociedades de Bromatología del exterior.

Con toda esa extensa lista de actividades podrían llenarse más carillas pero no es la intención abrumarlos con muchos detalles. Sin embargo, deseo comentar que en 1976, una de las invitaciones que recibió fue la causante de un gran susto para todos (creo que fue mayor en el caso del propio Cattáneo). En esa época y habiendo aceptado la designación de Decano de la FCEyN, su salud se vio afectada, probablemente por las múltiples presiones y acosos que recibía desde todos los ángulos y niveles de la población de la Facultad. Afortunadamente para él y todos nosotros su problema de salud fue solucionado, pero el aviso resultó suficiente para que dejara la pelea política para otra gente y volviera a lidiar con sus amigos los lípidos y otras "yerbas".

La labor cumplida por nuestro homenajeado es enorme, el solo dato que 102 profesionales obtuvieron sus respectivos doctorados bajo su tutela sería más que suficiente para rendirle este número en su honor.

Cuando se trata de poder reseñar en corto espacio una vida profesional tan intensa y pletórica de tareas como la de nuestro apreciado don Pedro, es seguro que se producen olvidos (no intencionales) y errores.

He tratado de presentar hechos de su vida que quizás eran conocidos por los mayores pero probablemente no por colegas más jóvenes.

Pedro Cattáneo cumple con las líneas que escribió Robert Frost:

– *The woods are loverly, dark and deep,*
– *But I have promises to keep.*

– *And miles to go before I sleep,*
– *And miles go to before I sleep.*

Espero que su ejemplo de honestidad personal y profesional, su constancia en la defensa de sus ideales y su ejemplo de laboriosidad fecunda y constante, cunda entre lo jóvenes para que la Ciencia en la Argentina siga en constante progreso. Creo que es el sentir de todos los que admiramos al Dr. Pedro Cattáneo.

EDUARDO G. GROS

## BIBLIOGRAFIA


— C. V. del DR. PEDRO CATTÁNEO.
— V. DEULOFEU, An. Acad. Nac. Cs. Ex. Fi. Nat., 13, pág. 154 (1957).
— M. H. BERTONI, An. Asoc. Quím. Arg., 70, pág. 703 (1982).
— A. SORIANO. An Acad. Nac. Agr. Vet., XLIV (N°5), pág. 7 (1990).
— A. O. M. STOPPANI, An Acad. Nac. Cs. Bs. As., pág. 13 (1991).
— E. G. GROS, Actas Asoc. Quím. Argent., octubre 1992.
— R. FROST, *"Stopping by woods on a snowy evening"*.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (5 - 20)

# AMARANTOS GRANIFEROS Y HORTICOLAS CULTIVADOS. UN APORTE SOBRE SU COMPOSICION QUIMICA, VALOR NUTRITIVO Y UTILIZACION

*María Helena Bertoni*

Departamento de Química Orgánica (Orientación Bromatología y Tecnología de Alimentos). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN

Se presenta una información sobre antecedentes, características generales de la planta, trabajos realizados en relación a composición química general, valor nutritivo y utilización del grano y del follaje de especies cultivadas de amarantos de mayor difusión, así como el aprovechamiento de subproductos de su cultivo, con el deseo de contribuir a su mejor conocimiento y difusión.

## ABSTRACT

In view to offer a major knowledge and to increment it diffusion this report deals with the chemical composition, nutritional value and usefulness of the seed and foliage of different species of cultivated Amaranthus plants.

## INTRODUCCION

Las razones para promover el desarrollo de los cultivos andinos subexplotados se basan fundamentalmente en aspectos nutricionales, ecológicos y económicos, ya que constituyen un im-

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

portante suministro de energía, proteínas y de otros nutrientes esenciales para proveer una composición bastante balanceada de la dieta, especialmente para poblaciones de bajos ingresos. En los Andes el maíz estuvo acompañado de otras especies con las cuales el hombre trató de asegurar una mejor alimentación y por intuición, combinó el maíz deficitario en lisina, con la quinua y el amaranto, ricos en ese aminoácido.

En el desarrollo de la agricultura moderna, el valor de los cultivos tradicionales ha sido relegado por los cultivos comerciales. Las prioridades gubernamentales se han orientado hacia la promoción de los principales cereales, algunos de los cuales han constituido los alimentos básicos en las dietas poblacionales. Asegurar su abastecimiento ha sido la base de la mayoría de las políticas de seguridad alimentaria. No obstante la "verdadera seguridad" radica en la "diversidad". Los cultivos autóctonos subexplotados contribuirían a mejorar tal seguridad: la alimentación familiar (fuente de energía y de otros nutrientes esenciales, pequeñas áreas de cultivo, insumo mínimo de agua y de fertilizantes), su producción en mayor escala y utilización permitiría además de rescatar recursos fitogenéticos, mantener el balance ecológico y la fertilidad de los suelos. Este tipo de plantas, que no se explotan en grandes áreas y de manera generalmente no tecnificada, tienen al presente producciones diversas y no uniformes. La promoción y comercialización de estos cultivos traería como beneficios la mejora del estado nutricional de la población (programas de complementación de alimentos), nuevas alternativas agrícolas rentables (mercado interno y externo, procesamiento de nuevos productos) y más estabilidad en la economía del campesino y del país en general [1, 2].

Tales programas, particularmente los de alimentación complementaria para grupos nutricionalmente vulnerables, cuando van unidos a una educación nutricional-sanitaria y de mejoramiento agrícola, son generalmente más efectivos [3].

## I. AMARANTOS. CONSIDERACIONES GENERALES

El amaranto de los Andes no llegó a tener la importancia en la alimentación de sus pueblos que tuvo entre los aztecas (México), pues se lo cultivaba en parcelas pequeñas y aisladas. Los granos molidos de "huahti" de los aztecas (A. hypochondríacus) llamado "bledo" por los españoles, eran usados en una mezcla conocida como "zoale" o "tzoalli" con la que moldeaban ídolos que utilizaban en algunas ceremonias (festival del "huahti", México). Hernán Cortés, fue el europeo que la menciona [4]. Se considera que por este uso, después de la conquista, la iglesia prohibió y combatió el cultivo de amaranto [5]. En los Andes, Fray Bernabé Cobo (1653) hizo una referencia al amaranto y lo distinguió claramente de la quinua (posible influencia de la capa que contiene saponinas), mencionando dulces hechos con semilla de bledo y miel y sólo recién a comienzos de este siglo se volvió a mencionar el amaranto [2].

A partir de 1973 se iniciaron los primeros estudios agronómicos en la Universidad del Cusco, a cargo del Ing. O. Blanco, recibiendo el mayor impulso en la década del '80, gracias al empeño del Ing. L. Sumar. Una colección de amarantos fue llevada de Tarija a la Universidad del Cusco (1979). El material genético de estas especies se colectó en Ecuador, Perú, Bolivia y así se dio inicio al banco de germoplasma de amaranto, que se conserva en el Cusco y que ha permitido distribuir material en todo el mundo [4].

Hoy, como resultado de distintas investigaciones, tanto el grano como el follaje de amaranto constituyen pilares básicos de la agricultura y de la alimentación humana y animal. Así, el amaranto cultivo subexplotado, tiene mucho que ofrecer por sus notables cualidades.

En 1989, la Facultad de Agronomía de la Universidad de La Pampa, inicia la edición de un Boletín informativo destinado a experimentadores, docentes y estudiantes universitarios, industriales y empresas agropecuarias interesadas en aspectos relacionados con el tema amaranto ti-

tulado: "Amarantos, Novedades e Informaciones". Su finalidad fue y es la de difundir toda información sobre el particular, incluyendo novedades surgidas de investigación, comentarios sobre publicaciones recientes y de libros, disponibilidad de germoplasma y de semilla, breves resúmenes de trabajos originales remitidos por personas o instituciones del país y del extranjero. A partir de marzo de 1995 (Bol. N°18) y con el título: "Amarantos - Trabajos breves, Comentarios bibliográficos, Resúmenes, Crónicas, etc." (Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA y Fac. Agron. UNLPam., Rep. Arg.) y con el deseo de concretar sus objetivos al multiplicarse la labor experimental sobre amarantos en nuestro país y en el exterior, se le da prioridad a la publicación de estos trabajos (sin perjuicio de que sus autores opten por enviarlos a revistas científicas de mayor circulación y jerarquía) y sin dejar de lado las informaciones mencionadas en sus primitivos objetivos [6,7]. El primer Boletín incluye una tabla con los nombres botánicos, abreviaturas sugeridas y nombres vulgares seleccionados de amarantos cultivados y de otras especies de posible valor económico, con el fin de simplificar y estandardizar sus designaciones [6].

El género *Amaranthus* pertenece a la familia *Amarantacea* y es uno de los cultivos estivales de grano menos explotado, no obstante ha sido objeto de numerosos estudios desde el punto de vista agronómico como nutricional. Es un producto autóctono de la Región Latinoamericana y comprende más de 50 especies distribuidas en todo el mundo [7]. Varias de ellas son importantes malezas de cultivo, en tanto que otras constituyen plantas útiles por suministrar semilla y/o follaje comestible, entre las que cabe mencionar cinco especies americanas, cultivadas por indígenas desde épocas precolombinas y que en la actualidad se cultivan dada su notable calidad para consumo humano o como forraje: *A. caudatus* L., *A. cruentus* L., *A. dubius Mart.* ex Thellung, *A. hypochondriacus* L. y *A. mantegazzianus* Passer. Las mencionadas especies cultivadas tienen como características el ser hierbas anuales, con una vía fotosintética $C_4$ (elevada eficiencia fotosintética) y por consiguiente, es capaz de fotosintetizar a altas temperaturas con una absorción reducida de $C0_2$. Tienen un potencial muy elevado para una alta producción de fitomasa por unidad de área en un período relativamente corto de tiempo [8]. Varias de ellas son de alto porte (a veces 2 m de altura), de elevada producción de semilla que puede llegar a los 3000 kg (inflorescencia de gran tamaño con granos pequeños de alrededor de 1 mm diám., generalmente de forma lenticular y de coloraciones variadas). Es un pseudocereal robusto y bien conocido por su adaptabilidad a un rango amplio de condiciones de clima y de suelo. Se puede cultivar entre 0 y 3000 m. s. n. m. A mayores alturas, las heladas afectan su desarrollo. Su resistencia al medio ambiente y eficaz utilización del agua, son cualidades esenciales para competir, como cultivo, con las limitaciones de tierra y decrecientes provisiones de agua.

En nuestro país, su cultivo todavía es a nivel experimental, fue y es objeto de numerosos trabajos de fitomejoramiento (INTA, Est. Exptal. Agrop. Anguil, La Pampa) que estuvieron a cargo del Ing. Agr. G. Covas, justificados por la buena adaptación a las condiciones ambientales locales de los amarantos cultivados, incluyendo híbridos entre especies, subespecies y líneas, concretando finalmente la producción a los siguientes cultivares:

Plantas sin pigmento antociánico en ninguna de sus partes: *A. mantegazzianus* cv. Don Manuel (el nombre del cv. está dedicado al Dr. Manuel Sadosky, entusiasta propulsor de la incorporación de nuevos cultivos a la agricultura nacional) y *A. mantegazzianus* cv. Don Juan y Plantas con pigmento antociánico en toda la planta o en alguna parte de ella: *A. cruentus* cv. Don Guiem y *A. cruentus* cv. Don Armando [9].

A comienzos de la década del '80 se iniciaron en nuestro país estudios químicos y bioquímicos en semilla y follaje de amarantos (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA), que dieron lugar a varias publicaciones sobre el tema; a trabajos de similar naturaleza en las Facultades de Agron. de la UNLPam. y de Quím., Bioquím. y Farm. de la Univ. Nac. de San Luis, a trabajos sobre aspectos citogenéticos (Genética II, Fac. Cienc. Extas. y Nat. UBA) y en mate-

ria de fitomejoramiento (Fac. Agron. UNLPam.). En julio de 1987 se realizaron en la UNLPam. las "Primeras Jornadas Nacionales sobre Amaranto", donde se expusieron comunicaciones relacionados con estos temas.

## II. AMARANTOS CULTIVADOS. ESTUDIOS SOBRE SEMILLA

Nuestros primeros trabajos experimentales sobre características físicas de las semillas de amaranto y sus propiedades nutricionales se realizaron sobre muestras de semilla integral enviadas por el Ing. Agr. G. Covas, cosechadas en 1982 en parcelas experimentales de la Fac. Agron. UNLPam. Las semillas de *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* provinieron de una única cosecha (que son de floración tardía), en tanto que las de *A. cruentus* (de floración precoz) correspondían a dos cosechas, analizadas separadamente. Los valores de rendimiento en aceite crudo de extracción (hexano) cubren el ámbito registrado en literatura (7-9% b. s.), con índices de yodo entre 125,8-129,6 (típicamente semisecantes), con elevados contenidos en insaponificable (10-13% aceite) en concordancia con el alto nivel de esteroles totales (1547-3385 mg%g aceite) y en escualeno (5210-7370 mg%g aceite) (identificado a través de su transformación en el derivado dodecabromado) y acordes ambos componentes con los mencionados en literatura. Son considerados excepcionalmente elevados frente a la mayoría de los valores observados en aceites seminales corrientes.

Los niveles de tocoferoles totales (69-83 mg%g aceite), similares a los hallados para aceites de germen de maíz y sorgo argentinos, señalan que poseen similar defensa frente a fenómenos de autoxidación. Las composiciones acídicas (CGL) mostraron concentraciones concordantes en sus componentes mayores (16:0, 18:1 y 18:2) a las señaladas en literatura para distintas especies de amarantos. Se destaca la presencia de un ácido tentativamente señalado como 16:3 entre sus componentes acídicos [10].

El fraccionamiento de los insaponificables respectivos y su análisis por CG-TRR, GC-EM y RPM para las mezclas de esteroles en cada caso, mostró que las tres especies contienen los siguientes componentes principales: $\Delta^7$-brasicasterol, $\Delta^7$-campesterol, $\Delta^7$-estigmasterol, $\Delta^7$-sitosterol y $\Delta^7$-fucosterol [11].

Las respectivas harinas residuales de extracción, examinadas en su composición química general, mostraron contenidos en cenizas (3,1-3,3), proteína (N x 5,85, factor para amaranto) (16,4-20,6) y fibra cruda (2,9-3,6% b. s.) comprendidos entre los citados en literatura para semilla de amaranto. Son valores más altos que los correspondientes a la mayoría de los cereales (maíz, sorgo, arroz), al igual que los niveles de calcio y magnesio. Los contenidos en fósforo total son altos y concuerdan con los hallados para granos de cereales y de leguminosas, con muy bajas relaciones calcio/fósforo total respecto del valor óptimo señalado por Organismos Internacionales para fines nutricionales (1-1,2). Cabe destacar el tenor en lisina disponible (lisina reactiva) (5,8-6,2 g/16 gN) muy superior al de las proteínas de cereales y comparable a la del poroto de soja de procedencia nacional. La harina de semilla de amaranto constituye una fuente de valor potencial para suplementar otras fuentes proteínicas vegetales (cereales, girasol, etc.).

La ausencia o muy pequeñas cantidades de azúcares es característica de semillas maduras de cereales, siendo el hidrato de carbono principal el almidón (59-63 % b.s.), acorde con los datos de bibliografía. El almidón de amaranto contiene bajo tenor de amilosa (4,4-7,1% de almidón b. s.), estando constituido esencialmente por amilopectina. Un muy bajo contenido o prácticamente nulo de amilosa es característica fundamental del almidón tipo ceroso ("waxy").

Las concentraciones de lípidos remanentes en las tres harinas señalan la presencia significativa de lípidos polares (fundamentalmente fosfolípidos). Los niveles de nitratos y oxalatos,

que se mencionan como significativos en hojas y tallo de estas plantas, fueron sumamente bajos, al igual que muy reducida la presencia de taninos, comparativamente a los niveles hallados en harinas de semilla integral de sorgo y de porotos (*Phaseolus vulgaris*).

Con el fin de observar si el grano de amaranto contenía entre sus proteínas a las gliadinas, se operó sobre semilla de *A. cruentus* cv. Don Guiem y de *A. mantegazzianus* cv. Don Juan, extrayendo primero el aceite y desarrollando técnicas de extracción de proteínas totales, separación por electroforesis en gel de poliacrilamida y comparación de bandas con las de gluten de trigo. Se estableció ausencia de gliadinas de bajo y alto peso molecular en los amarantos ensayados. Su ausencia es importante en medidas terapéuticas que se observan en la preparación de dietas para celíacos (síndrome de malabsorción por ingestión de productos que contienen gluten, del que forman parte las gliadinas) [12]. Estos ensayos fueron concordantes con los realizados en la Fac. de Farm. y Bioquím., UBA. Se señala la conveniencia de intensificar la investigación en otras especies de amarantos graníferos de parentezco más o menos estrecho con los citados [12, 13].

Bressani y col. se refieren a la composición general de 14 cultivares de 4 especies de amarantos (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*) y señala como conclusión que tendrían que considerarse semillas con contenidos no menores del 15% en proteína cruda y seleccionar los cultivares con niveles de lisina no menores de 6,4% de proteína cruda, ya que tienen una digestibilidad del 85% (grano entero). Los valores de la REP representan el 81-94% del de la caseína, mostrando así una calidad nutricional excepcional [14].

Entre otros datos bibliográficos se mencionan además el alto contenido en aminoácidos azufrados (metionina + cistina) 4-4,7 g/16gN, especialmente en proteínas del germen y cubierta, siguiendo el perispermo, pudiendo suplementar proteínas de granos de leguminosas (soja, porotos, etc.). El primer aminoácido limitante es la leucina. La semilla no contiene carotenos [15].

En el laboratorio de Microbiología de Alimentos (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA) se realizó un estudio cuyo objetivo fue el de caracterizar la flora fúngica toxicogénica para evaluar el riesgo potencial de contaminación con micotoxinas, aspecto hasta el momento poco estudiado en este producto. Las muestras de granos de amarantos, enviadas por el Ing. Agr. G. Covas (Fac. Agr. UNLPam.) dieron lugar a dos trabajos experimentales cuyas conclusiones fueron las siguientes: La contaminación más significativa del grano de amaranto, como de la mayoría de los cereales y oleaginosas, es la presencia de hongos y micotoxinas. Estos estudios han permitido identificar como componentes de la microflora a varias especies productoras de metabolitos secundarios tóxicos, tales como *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (aflatoxinas), *A. versicolor* (esterigmatocistina), *Penicillium citrinum* (citrinina), *P. viridicatum* (ácido penicílico) y *Fusarium equiseti*, *F. moniliforme* y *F. semitectum* (zearalenona). La biosíntesis de aflatoxinas se ve favorecida en las regiones de clima tropical y subtropical, ya que requiere alta humedad y temperatura (entre 25 y 30°). Las temperaturas bajas en cambio, favorecen la producción de micotoxinas de Fusarium, tal es el caso de la zearalenona, encontrada como contaminante natural en granos de amaranto que habían sido almacenados en condiciones inadecuadas. La presencia de esta micotoxina y de varias cepas de hongos toxicogénicos en la flora fúngica de amarantos alertan el peligro potencial de contaminación con metabolitos secundarios tóxicos si los granos no son correctamente manejados durante las etapas de pre- y poscosecha [16, 17].

Las semillas de especies de *A. graníferos* son diminutas, de acuerdo a especie, cultivar y condiciones ambientales. Dado que el tamaño de la semilla tiene implicaciones agronómicas, el Ing. Agr. G. Covas, remitió a nuestro laboratorio (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA) muestras de semilla de *A. cruentus* L. cv. Don Guiem (var. cultivada muy homogénea, de color claro, opacas, extraídas por cosecha manual de la misma parcela), que mediante tamices de calibres apropiados se separaron en dos muestras (de 1,4 ó más mm diám. y de menos de 0,8 mm., valores medios). El objetivo consistió en determinar la incidencia del tamaño de la semi-

lla de un determinado cultivar en la composición química de la misma y establecer si la diferencia de tamaño (y peso correlativo) inducía cambios en su composición y valor nutritivo. Los resultados de las evaluaciones realizadas (N° sem/g, peso hectolítrico, peso sem/g promedio, humedad, cenizas y aceite % y sus características fisico-químicas y composición acídica, así como la composición general de la harina residual de extracción, incluyendo lisina disponible) sobre muestras de semillas pequeñas y grandes, no mostraron diferencias de significación entre uno y otro tipo. Como conclusión, al parecer a nivel intravarietal y condiciones ambientales similares, la relación peso tegumento + embrión vs. perisperma se mantiene constante dentro del margen entre semillas pequeñas y grandes con que se operó en este ensayo. Esta relación importa, ya que los nutrientes más críticos (proteínas, lípidos) tienden a concentrarse en el embrión (que es fracción significativa en la semilla). En consecuencia en los trabajos de fitomejoramiento hacia semillas grandes, a nivel intraespecífico, no se modificaría mayormente la relación señalada; ello podría tal vez ocurrir a nivel interespecífico [18].

Una de las múltiples formas de aplicación de los granos de amaranto es su consumo previa germinación, utilizándose los brotes directamente en sopas, ensaladas, etc. o bien desecados y molidos, con lo que se obtiene una harina que tiene varias aplicaciones (salsas, cremas, alimentos para infantes, etc.). Sobre este tema, un trabajo inicial y limitado al análisis de evaluación de proteína y pared celular, fue llevado a cabo en la UNLPam. [19] sobre harina molida y tamizada de plántulas de *A. cruentus* cv. Don Guiem, obtenidas de la germinación de los granos (estufa 25° y oscuridad, hasta alcanzar una longitud de 1,0-1,5 cm). Se destaca que el contenido en proteína cruda queda prácticamente invariable (17,6% plántulas: grano original 18,2% b. s.), mientras que la pared celular (FDN) de las plántulas se reduce considerablemente (1,21% plántulas: grano original 12,37%), debido posiblemente a que dicho material se elimina con los tegumentos de los granos que se separan en las semillas germinadas.

El nombre "brotes" de amaranto, se da a las semillas germinadas a similitud de los aplicados a "plántulas" de alfalfa, soja, porotos, etc. Existen pocos antecedentes sobre la eficiencia de esta forma de utilización de los granos de amaranto. Bressani y col. informaron sobre la composición química de granos germinados (48 y 72 h de germinación) de *A. cruentus* L. en relación a los granos no germinados, acusando similar nivel de proteína, menor contenido en extracto etéreo, presencia de azúcares reductores, mayor proporción de azúcares solubles totales y contenidos en tiamina, riboflavina y ácido ascórbico en los germinados. Observó en lotes (72 h) un incremento de NPR (2,7 vs. 2,0) y disminución evidente en brotes sometidos a cocción (3,8 vs. 1,4).

En procura de mayor información, el Ing. Agr. G. Covas, envió a nuestro laboratorio (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA) "brotes" de granos de *A. cruentus* L. cv. Don Guiem (72 h después de aparición de la radícula del embrión), dejados secar naturalmente y la harina integral de los mismos y la de un lote de granos no germinados fueron analizadas con los siguientes resultados: aparición de hidratos de carbono reductores, disminución de hidratos de carbono sacarificables, incremento de calcio, de proteínas y de lisina disponible (coincidente con el aumento de la calidad de la proteína señalada por Bressani) y disminución de lípidos totales (Folch). La composición acídica de estos últimos acusa un aumento significativo en la concentración de los ácidos grasos esenciales (18:2 y 18:3) en los granos germinados respecto de los no germinados. La composición cualitativa de los esteroles (fracción insaponificable del aceite) es la misma que en los no germinados, registrándose no obstante, un cambio en las concentraciones de dos de ellos (disminución de $\Delta^7$-sitosterol y aumento de $\Delta^7$-estigmasterol) en el germinado [20].

También las "plántulas" de amaranto (cuando tenían 2-4 hojas normales, además de los cotiledones y parte del hipocotilo) fueron objeto de evaluaciones (Fac. Agr. UNLPam.) de β-caroteno y de microelementos en granos de las especies *A. cruentus* L. cv. Don Guiem y *A. mantegazzianus* Pass. cv. Don Juan, señalándolas como fuente de alto valor nutritivo. Se destacan el contenido relativamente alto de β-caroteno en *A. cruentus* (201,6 ppm. b. s.), que práctica-

mente duplica el valor hallado en *A. mantegazzianus* (112,5) y mayor nivel en los microelementos: hierro, cobre y molibdeno en semilla y pixidios más pétalos de *A. cruentus* [21].

El amaranto de grano (*A. hypochondriacus* var. local Yercaud) fue objeto de estudio después de distintos períodos de germinación (24, 48 y 192 h), por un grupo de investigadores de la India [22], demostrando la variación de nivel de hidratos de carbonos y componentes nitrogenados (cambios en las actividades de α- y β-amilasas, contenido de almidón, azúcares, proteína y lisina). La acción conjunta de las amilasas en su mayor actividad (durante la germinación) se tradujo en un descenso en el contenido de almidón y en un incremento en azúcares totales. El contenido en proteína disminuyó en granos germinados (48 a 192 h.) acompañado de un incremento en aminoácidos libres, entre otras variaciones señaladas.

Merece citarse, entre otros trabajos experimentales sobre composición química general y valor nutritivo de semilla de amarantos cultivados, el realizado sobre harina de semilla de *A. cruentus* cv. Don Guiem, que tiende a obtener índices para evaluar la calidad de sus proteínas (determinaciones de aminoácidos esenciales, UPN y digestibilidad verdadera), así como la evaluación de nitratos, oxalatos, actividades antitripsínica y ureásica, que demuestran el buen valor potencial alimentario del material estudiado por el equipo de investigadores de la Univ. Nac. de San Luis [23].

Con resultados comparables a los obtenidos en otros países, se señalan los logrados por un grupo de experimentadores de Nigeria (Africa Occidental) sobre composición química general, taninos, fitatos, lisina, aminoácidos azufrados, fracción lipídica, micronutrientes y valor nutritivo de semillas cosechadas de *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*, demostrando su muy buen valor alimenticio [24].

En Cuba, prácticamente no hay experiencia sobre el cultivo del amaranto. Sin embargo, existe voluntad de estudiar la posibilidad de introducir el amaranto en la alimentación de la población. El Instituto de Investigación Fundamental de la Agricultura Tropical, La Habana, Cuba, ha venido trabajando en la adaptación de algunas var. de amaranto procedentes de otras latitudes a las condiciones locales. Las semillas de amaranto analizadas fueron suministradas por la firma norteamericana "Walnut Acres" (P. A. E. U.) después del proceso de adaptación a las condiciones del clima de Cuba. Un estudio amplio de composición química general y de valor nutritivo abarcó: evaluación de macronutrientes, aminoácidos, presencia de alcaloides, cianuro, inhibidor de tripsina, actividad hemaglutinante, polifenoles, ácido fítico, fibra dietaria (in vivo), digestibilidad verdadera, UPN y ensayo de toxicidad en ratas (examen de vísceras), determinaciones sobre orina y sangre de ratas de experimentación y su comparación con los del lote alimentado con caseína y otras dietas comerciales (en los de tipo biológico). Las semillas se ensayaron crudas y calentadas en autoclave (121° por 10 min.). Este calentamiento parece tener un efecto beneficioso en la ingesta de los animales ensayados. Todos los datos químicos y biológicos (VB: 69), confirman la buena calidad de las proteínas de semilla de amaranto dentro del conjunto de las de origen vegetal [25].

## III. AMARANTOS CULTIVADOS. ESTUDIOS SOBRE HOJAS Y PENCAS

Los vegetales de hoja constituyen una fuente rica en varios nutrientes: proteínas, calcio, hierro, carotenos, ácido ascórbico, ribiflavina, etc. El principal problema que se presenta es la presencia de algunos antinutrientes (nitratos, oxalatos) que son eliminados o reducidos notablemente en su contenido después de cocción. El uso de las hojas de amaranto en zonas tropicales es un hecho bien establecido y se cultivan en muchos países del mundo.

Los hábitos alimentarios de la población pampeana en nuestro país, tienen características distintas con relación al de otras provincias. El desarrollo preponderantemente agrícola-ganade-

ro (su recurso más importante) y la cultura alimentaria que incorporaron los inmigrantes europeos (alto consumo de hidratos de carbono complejos) influyeron en estas características. Al estudiar el amaranto como cultivo alternativo, se observó que además de las ventajas agronómicas que representaba para la región, su follaje ("quelite") mostraba también, al igual que la semilla, altas cualidades nutricionales (buen nivel de proteínas, lisina, aminoácidos azufrados, fibra cruda, calcio, hierro, carotenos, vitamina C, etc.). En cuanto al grado de aceptabilidad de su consumo en distintas preparaciones, se pudo observar experimentalmente que la valoración fue positiva en sus caracteres organolépticos y preferenciales, lo cual posibilita el mejoramiento de la dieta habitual pampeana [26].

Los cultivares preferidos son los de color verde, pero puede que sean veteados o del todo pigmentados (a menudo estos últimos se cultivan como plantas ornamentales). Es probable que en el mundo el uso del amaranto como verdura sea mayor y más difundido que el del grano, probablemente porque resulta más fácil su cultivo. No sólo dá buen rendimiento y buen valor nutritivo, sino que ofrece una importante utilización en forma deshidratada.

Los amarantos de hoja son aptos para su comercialización al estado fresco, lo que debería hacerse el mismo día de la cosecha o al siguiente a más tardar. De ahí que para su preservación convenga la deshidratación. En esta forma competiría ventajosamente con el producto deshidratado de espinaca, cuyas aplicaciones son similares, especialmente en aquellas regiones donde no se producen hortalizas (semidesierto de la Argentina) [27].

A solicitud del Ing. Agr. G. Covas se llevó a cabo en nuestro laboratorio (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA) el análisis químico del follaje de tres especies americanas de amaranto (*A. caudatus* L., *A. cruentus* L. y *A. mantegazzianus* Pass.), provenientes de cultivos de la Est. Exptal. Agrop. Anguil (INTA), La Pampa, cosecha 1984. En este estudio se confrontaron los valores de contenidos en proteína cruda, cenizas fibra cruda, nitratos, fósforo total, calcio y ácido oxálico, con los señalados (obtenidos de literatura) para espinaca (todos expresados en base seca). *Amarantos* (ámbitos para las tres especies) - *espinaca*: cenizas (20,5-22,1) - 16,1; proteína cruda (23,0-26,4) - 34,4; fibra cruda (12,7-13,0) - 6,4; fósforo total (como P) (0,43-0,54) - 0,55; calcio (como Ca) (1,6-2,1) - 1,0; nitratos (como $N0_3^-$) (1,1-2,0) - 1,2 y ácido oxálico anh. (2,2-3,9) - 9,3% b. s. Para el follaje de amarantos, son superiores los contenidos de cenizas, fibra cruda, nitratos y calcio; en tanto que los de proteína cruda y ácido oxálico son mayores los de espinaca. Se destaca el alto valor de lisina disponible (4,0-4,3 g/16gN) y el de calcio en el follaje de amarantos. Los niveles hallados para actividad de antitripsina (2,5-4,6 UTI/mg prod. seco a 60°) en follaje de amarantos *A. cruentus* y *A. mantegazzianus*, resultaron bajos y similares a los de las respectivas semillas.

Una única determinación de taninos (*A. cruentus*) mostró un nivel muy bajo (26 mg de catequina % g hoja b. s.), coincidente con los mencionados en literatura para especies de amarantos. Se registró un muy bajo contenido en ácido fítico (como P) (vest. 31 mg%g bs.), sin datos bibliográficos para hoja de espinaca.

Ya que el follaje de amaranto puede consumirse en forma similar al de la espinaca, fue de interés evaluar los contenidos remanentes de proteínas oxalatos y nitratos después de cocción en agua con sal (sol. NaCl 0,25%, 15 min ebull., relación hoja-agua 1:33 p/p), con posterior escurrimiento sobre tamiz. Los valores de las relaciones de contenidos de proteína cruda, oxalato y nitrato con los respectivos contenidos totales (iniciales sobre hoja fresca), mostraron que el porcentaje de proteína remanente fue del 57 y 69 %, el de oxalato de 63 y 66 %, mientras que esencialmente todo el nitrato se eliminaba con el líquido de cocción (que se desecha). La relación oxalato remanente/oxalato inicial, es similar para amaranto y espinaca (mencionada en literatura sobre el particular); ello hace suponer que los niveles remanentes de follaje de amaranto después de cocción, no serían objetables [28].

El amaranto tricolor (*A. tricolor*) es una especie de consumo mundial, particularmente en los países del sudeste asiático. Prakash y Pal [29] informaron sobre el cultivo del follaje de cier-

tas líneas promisorias de *A. tricolor* ricas en carotenoides y proteína y bajos contenidos de nitratos y oxalatos, que fueron cultivadas en el National Botanical Research Institute (NBRI) en Lucknow (India) y vieron la necesidad de evaluar el follaje a fin de determinar su contenido nutricional frente a la posición de las hojas y edad de la planta, para señalar el tiempo óptimo para su consumo.

Operaron sobre muestras de *A. tricolor* spp tristis (AV-35) y *A. caudatus* (AG-303b AG-309 y AG-316), luego de recolectar hojas frescas de plantas de 30 a 40 días de edad, que sometieron al análisis. El trabajo ofrece una serie de gráficos sobre ambas especies, donde se pueden observar los cambios de niveles de los componentes en relación a la posición de la hoja y con el período de desarrollo (edad) de la planta. Concluyeron que el tercer mes de crecimiento fue el más adecuado para lograr las concentraciones óptimas de carotenoides y proteína sin grandes cambios en oxalatos y nitratos. También notificaron cambios observados en la composición de aminoácidos esenciales. La hoja de amaranto, con su alto contenido de carotenoides, proteína (rica en lisina), es al parecer superior a otros vegetales comerciales de hoja. Se observa menor nivel en estos componentes en el pecíolo y tallo.

Bressani [30] señala que es de gran interés profundizar los conocimientos acerca del contenido de β-carotenos biológicamente activos en el amaranto y evaluar los efectos de la cocción, ya que la mayoría de los valores aportados por la literatura son sobre materiales crudos. Los valores que se informan sobre carotenos en hojas de amarantos varían entre 1600 y 3000 µcg/lOOg de actividad de vitamina A, cifras relativamente altas comparables, sino más altas, que las de otras verduras.

Un trabajo complementario del anterior (India), se refiere al contenido de vitamina C en hojas de amarantos. Prakash, Pal y col. [31] señalan que el nivel de vitamina C varía entre 62 y 288 mg%g para amaranto tipo grano y tipo hortícola. En general, los de tipo hortícola contenían menos vitamina C que los de tipo grano en sus hojas. La variabilidad dependería de la posición de la hoja en la planta y de la edad de la misma. Estos datos pueden ser de utilidad en programas de fitomejoramiento con fines nutricionales.

Un estudio comparativo de dos cultivares de amaranto como hortalizas de hoja, se realizó en la Fac. Agr. UNLPam. (campaña 1989/90) entre *A. cruentus* L. cv. Don Guiem y *A. mategazzianus* Passer, sobre rendimiento de follaje después de dos cortes y su contenido en proteína cruda y pared celular:

*A. cruentus* L. cv. Don Guiem (valores medios)
 1er. corte: prot. cruda (20,7 %); pared celular (30,1 %)
 2do. corte: prot. cruda (11,5 %); pared celular (38,1 %)
*A. mantegazzianus* Passer (valores medios)
 ler. corte: prot. cruda (20,7 %); pared celular (29,4 %)
 2do corte: prot. cruda (10,2 %); pared celular (38,3 %)

Los datos señalados destacan la no significación estadística entre cultivares, para proteína cruda y pared celular, para un mismo corte, así como la notable declinación en el segundo corte para proteína e incremento en pared celular. Ello sugiere utilizar el primer corte como hortaliza de hoja, en tanto que el rebrote podría destinarse a la producción de semilla [32].

Con el nombre de "pencas" se conocen los pecíolos suculentos de algunas hortalizas de hoja. Cuando se utilizan, una vez separadas de las láminas foliares, tienen aplicación culinaria, como en el caso de la acelga (*β-vulgaris* var. cicla). En los amarantos hortícolas o de doble propósito, algunos cultivares desarrollan pecíolos que pueden utilizarse de la misma forma.

La prueba de degustación (que se realiza después de hervidas las pencas, 20 min.), mostró buena aptitud culinaria, ya que se tiernizan. Se usan en distintas confecciones como relleno de pastas, tortillas, etc. al igual que las hojas.

Dos cutivares de amaranto (*A. hypochondriacus* L. cv. Artasa 9122 y *A. mantegazzianus* Passer cv. Don Manuel) mostraron tener buenas aptitudes como hortaliza de hoja tanto por la productividad de follaje como por su apetecibilidad. Las muestras a examinar se obtuvieron cortando los cogollos antes de la floración, deshidratándolos a la sombra y estrujándolos de manera que va el cogollo integral comprendiendo hojas con su pecíolo y tallo. Como testigo se utilizó *A. mantegazzianus* cv. Don Manuel (que es el más apetecible y que muchos prefieren a la espinaca o acelga). Ambos cultivares, el primero introducido de los EE.UU. de N. A. por una firma privada y el segundo obtenido en nuestro país a partir de un mutante del *A. mantegazzianus* cv. Don Juan, mostraron en pruebas de degustación, buenos caracteres organolépticos con ligera superioridad del primero.

Las determinaciones analíticas de los dos follajes, fueron. comparadas en sus valores con los de una muestra de espinaca deshidratada adquirida en el comercio (envasada en bolsitas de polietileno). Fueron remitidas por el Ing. Agr. G. Covas a nuestro laboratorio (Bromatología, Fac. Cienc. Exact. y Nat. UBA) para determinar su composición química general y ensayos de rehidratación. Los resultados (expresados en base seca), concuerdan con los registrados en literatura para amarantos hortícolas. Se señalan las siguientes observaciones: el mayor rendimiento del material deshidratado llevado a producto hidratado para los cultivares de amaranto, probablemente debido a la mayor proporción de pecíolo y tallo con respecto a la muestra de espinaca. Ensayo de rehidratación: sobre producto total drenado (100 g) (amarantos 396 y 366; espinaca 241 g), de igual manera es mayor el porcentaje de fibra cruda para los dos cultivares de amaranto (13,06 y 12,03 % b. s.), espinaca (7,75 % b. s.). La misma causa sería responsable del mayor contenido en proteína y lípidos (*A. hypochondriacus* cv. Artasa y espinaca), aclarando que el primero es menos folioso.

Con respecto a las composiciones acídicas de los respectivos lípidos (CGL), resultaron similares para ambos cultivares de amaranto, incluyendo la presencia de un componente acídico tentativamente señalado como *16:3*, ya comentado en un trabajo anterior 10. Si bien cualitativamente se registraron los mismos componentes en $C_{18}$ (*18:1, 18:2 y 18:3*) en todas las muestras analizadas, en el caso de la espinaca (muestra deshidratada industrialmente), la distinta sensibilidad de dichos ácidos no saturados frente a un procesamiento por calor, desde un punto de vista cuantitativo le resta confiabilidad en su comparación con los valores hallados para amarantos.

La prueba de la "espuma" (cm) para la detección de saponinas, señaló un menor nivel para espinaca (observación a 1 min.) a las 3 horas, los niveles fueron similares para las tres muestras. Entre los dos cultivares de amaranto, *A. hypochondriacus* cv. Artasa fue ligeramente inferior, lo que estaría en relación con su ligera mayor apetecibilidad. Las diferencias observadas en composición química responderían preferentemente a la mayor proporción de pecíolo y tallo en amarantos, desde que en la espinaca se cosechan las plantas foliosas desde la base [33].

Entre los vegetales pigmentados, hay mucho interés en amarantos tintóreos para proveer colorantes naturales para bebidas y alimentos, además de ofrecer las características organolépticas de una excelente hortaliza de hoja.

El *A. hypochondriacus* cv. Don Pedro (en homenaje al Dr. Pedro Cattáneo, que ha liderado las numerosas investigaciones sobre composición química de los amarantos ensayados en nuestro país). es un cultivar tintóreo de profundo color purpúreo (amarantina) que alcanza a toda la planta. Se trata de un material originado en una accesión derivada de la ciudad de Santa Rosa (Prov. de La Pampa). El Ing. Agr. G. Covas señala que la Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, cuenta con semilla de esta interesante planta tintórea y hortícola para siembra en una amplia área y tener así semilla suficiente para iniciar su difusión. Una muestra ha sido remitida a Israel para su ensayo, ya que en este país hay interés por los colorantes naturales para alimentos.

También existen en las tres especies de amarantos graníferos (*A. cruentus, A. hypochondri-*

*acus* y *A. caudatus*) razas pigmentadas (amarantina), no así en *A. mantegazzianus*, que no tiene tal pigmentación (a excepción de sus híbridos con A. pigmentados; estos últimos, cuando son intensamente coloreados reciben el nombre vernáculo de "sangorache" o "sangoracha" [34].

El *A. dubius* es posiblemente el mejor amaranto hortícola por sus características organolépticas. De la colección de germoplasma conducida a campo en la campaña 1994-95, una accesión de *A. dubius Mart.*, ex Thellung, individualizada como L. P. 175, coleccionada en Isla Margarita (Venezuela), volvió a mostrar buena productividad de follaje, iniciándose por ello su multiplicación como material básico para la difusión como nuevo cultivar.

Esta especie de la región del Caribe, se cosecha al estado silvestre y también se la cultiva como hortaliza, ya que la semilla es negra, diminuta y sin valor.

Una pequeña muestra de *A. dubius Mart* conjuntamente con otra correspondiente a *A. hypochondriacus* L. cv. Don Pedro (cogollos del ápice de las plantas y sus ramificaciones tomadas a no más de 15 cm desde el extremo del corte y deshidratados naturalmente al resguardo del sol (Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa) fueron remitidos por el Ing. Agr. G. Covas a nuestro laboratorio (Bromatología, Fac. Cienc. Extas. y Nat., UBA) a fin de evaluar algunos componentes mayoritarios (desde que no había posibilidad de envío de mayor cantidad). Los resultados se confrontaron con los logrados con anterioridad sobre *A. mantegazzianus* cv. Don Manuel y espinaca (*Spinaca oleracea*). *A. dubius Mart* mostró un buen nivel de proteína cruda (34,95% b.s.) que supera al de las otras dos verduras confrontadas y un nivel algo inferior en fibra cruda (8,68 % b. s.) respecto de los otros dos amarantos mencionados. En cuanto a su apetecibilidad, ambos amarantos resultaron muy aceptables y para algunos paladares, no inferiores al de la espinaca [35].

El *Amaranthus* greggii s. Wats es un atípico amaranto, originario de América del Norte (de la costa caribeña de México y sur de los EE.UU. de N. A.) y está integrado últimamente al género *Amaranthus*. Es una especie perenne, con hojas cuya lámina es semicarnosa (una excepción en el género *Amaranthus*). La semilla coleccionada en las proximidades de Veracruz (México) fue cultivada experimentalmente en Santa Rosa (La Pampa, Argentina) en invernadero, sin llegar a florecer. Por sus características organolépticas y algunos ensayos químicos: bajo tenor de saponinas (prueba de la espuma), buen valor de proteína cruda (25 % b. s.), mayor durabilidad al estado fresco después del corte (confrontado contra *A. hypochondriacus* cv. Artasa 9122 y *A. mantegazzianus*) y bajos niveles de oxalatos y nitratos, se considera de posible utilización como hortaliza de hoja (para su mejor calificación se ha sugerido completar las evaluaciones de otros componentes de interés nutricional) [36,37].

## IV. AMARANTOS. ESTUDIOS SOBRE SU APLICACION - DIFUSION

Los cereales constituyen la base de la alimentación de numerosos países de América Latina. Por consiguiente, el mejoramiento de la calidad biológica de sus proteínas se presenta como una posibilidad atrayente para mejorar la situación alimentaria, especialmente para aquellos grupos vulnerables de la población. La conveniencia de mejorar la calidad nutricional de los productos existentes en el mercado, aprovechando la aceptación de que ya gozan, es en gran parte preferible a la introducción de "nuevos productos". Los programas de esta índole dependerán, dada la variabilidad de condiciones de vida y hábitos existentes en dichos países, de tener en cuenta que la relación entre "aceptabilidad" y "adopción" de un producto es compleja. También conviene considerar la disponibilidad en el país, de los componentes de producto complementado hacia un costo adecuado, la de intensificar la difusión de sus cualidades, de orientar adecuadamente a la población con miras a lograr un mejor equilibrio nutricional y la de ofrecer una presentación atractiva (estudios de mercado).

Un rápido análisis sobre estudios de utilización tanto del grano como del follaje de amarantos, sugiere su valor potencial para formar parte de mezclas con cereales, leguminosas, etc. en la formulación de alimentos tradicionales.

La utilización de semilla de amarantos en combinación con trigo, reúne las cualidades inherentes a ambos granos, aprovechando la aceptabilidad que tiene el pan del trigo como elemento básico de la canasta familiar. Las preparaciones con un nivel de sustitución del trigo de hasta 10-15% de amaranto acusan buena aceptabilidad y digestibilidad. Se consideró mas apropiado utilizar un pan integral comercial (debido a que el de trigo es blanco) pues al incorporar grano de amaranto le daba un color, textura y apariencia similar [15, 38].

En un trabajo de Bressani y col. [39], se señala que tanto las masas como las galletas dulces a base de harina de trigo comercial (que se usa en productos de panadería), con o sin agregado de harina de soja, pero con incorporación de semilla de amaranto expandido (*A. cruentus* L.) fueron superiores en calidad proteínica a la formulación testigo (sólo con harina de trigo). Se ensayaron formulaciones con 12 y 17 % de harina de amaranto y con 7 y 20 % de harina de soja integral y hasta un 50 % de grano de amaranto en "molletes", confirmando el efecto suplementario de la proteína de amaranto a la del trigo, sin afectar las características físicas de los productos después de horneado.

A nivel piloto, se desarrolló una pasta-sopa con base en una mezcla de harina de amaranto y de trigo (40:60 en peso), que mejoró en sus características con el agregado de 0,2 % de estearoil lactilato de sodio. Además de cumplir con los requisitos nutricionales esperados (19,2; de proteína cruda), tuvo una apetecibilidad calificada como "gusta moderadamente" - "gusta mucho" [40]. Asimismo se desarrolló un alimento infantil tipo papilla (para edad de 3-12 meses) utilizando como materias primas semilla de *A. hypochondriacus*, harina de trigo, harina de soja desgrasada y concentrado de fruta de 60° Brix. La mezcla satisfactoria respondió a las proporciones 70:20:10 (amaranto:soja:trigo).

Se utilizaron en la serie de ensayos, granos de amaranto germinado (con mayor nivel de lisina) además del grano integral de amaranto y amaranto reventado. Las formulaciones con grano integral y reventado requirieron espesantes (goma guar 0,1 %) [41,42].

En los EE.UU. de N. A. son repetidos los esfuerzos realizados para llevar al consumo popular productos que van desde el dulce elaborado con grano de amaranto reventado, tan popular en México, hasta mezclas para pasteles y waffles a base de harina de trigo. En México se producen, no sólo la "alegría" tradicional, sino una serie de productos de extrusión, pasteles y galletas. Se expenden concentrados proteínicos, amilo-proteínicos para su utilización en varios productos de panificación, repostería, tortillas de maíz y de trigo, pastas y confites. Se procesan nuevos productos como "mazapanes" enriquecidos (con hojuelas de avena) que se incorporan a licuados de frutas, atoles, sopas, etc. Se comercializan formulaciones infantiles y para adultos, enriquecidas con calcio, hierro y ácidos grasos esenciales. Se hace referencia tanto a la calidad proteínica, como a la relativa ausencia de factores antinutricionales y características del grano y harina de amaranto [43].

Referente a las aplicaciones de los amarantos graníferos en la Fac. Agr. UNLPam., se realizaron preparaciones de las más populares formas de "rosetas", que se obtienen (como el "pororó" de maíz), colocando capas delgadas de granos de amaranto sobre superficies calientes hasta que se haya completado el reventado o "popeado", Procurando no sobrepasar temperatura y tiempo adecuados a fin de no afectar su calidad nutritiva. Se consumen como tal o se aplican en la confección de otros productos. En la elaboración de las "alegrías", que son bloques de variadas formas y tamaños, los granos de amaranto se cuecen con otros ingredientes (miel de abeja, azúcar o jarabe de maíz, rosetas y en algunos casos manteca o margarina), la mezcla colocada en moldes, se retira cuando está fría. Se pueden agregar aromatizantes (jugo de limón, pasas de uva, trozos de nuez o de almendra). Se consumen directamente o envuelven en envase plástico transparente, pudiéndose conservar en refrigerador varios días.

La región semiárida pampeana sería una zona apropiada para esta agroindustria, como notable recurso alimentario.

En algunos Congresos y Simposios sobre amarantos (a los que concurrieron representantes de Argentina, México, Perú, Bolivia y Ecuador), hemos probado estos productos y varios otros con grano de amaranto con muy buena aceptabilidad [44].

En el "II° Simposio Nacional de Cultivos Estratégicos de Valor Alimenticio: Quinoa y Amarantos", realizado en S. S. de Jujuy (Argentina) el 28-30 de abril de 1992, el equipo de investigadores de la Fac. Agron. UNLPam., liderados por el Ing. Agr. G. Covas, ofrecieron productos elaborados con granos de amaranto para su degustación entre los presentes.

En Perú, al grano de amaranto (al que denominan "pequeño gigante"), se lo conoce con el nombre de "kiwicha" y al grano reventado como "kiwi-pop", que se consume tal cual o con miel, leche, té o mate, al igual que la harina tostada de kiwicha, obtenida por molienda del grano reventado.

Se utiliza en preparados con harina de trigo para elaborar pan, galletas, fideos, tortillas y tortas[45].

Entre las aplicaciones del grano y del follaje de amaranto merece mencionarse la "Receta para sopa-crema, Todo amaranto", apta para celíacos. La expresión "Todo amaranto" está basada en la utilización de derivados del grano y del follaje de amarantos y el hecho de que no incluya componentes como trigo, avena, cebada o centeno es apta para su consumo por celíacos. Entre sus ingredientes cuentan la leche, sal y condimentos.

Se valora la participación de la Asociación de Celíacos de la Argentina, la promoción a imitar por otros países, a fin de satisfacer la demanda de alimentos "no-TACC" o "sin-TACC" para celíacos (señalado entre las conclusiones del II° Simposio antes mencionado).

En la India [46], la semilla de amaranto es comúnmente utilizada en forma de dulce, conocido como "Laddoos" y el desarrollo de mezclas alimenticias para el destete se basó en la disponibilidad de alimentos locales (mezclas en distintas proporciones que comprenden: trigo tostado, arroz tostado, mijo malteado, amaranto tostado, frijol mungo tostado, cebada malteada y azúcar moreno) y ofrecen una oportunidad para la explotación comercial del grano de amaranto.

Las hojas verdes de amaranto ocupan un lugar importante en la alimentación del hombre en Africa tropical, donde son generalmente utilizadas en la preparación de salsas o como un complemento alimentario.

En Cameroun, las especies *Vernonia* spp. y *Amaranthus* spp. son las más consumidas entre las hortalizas, siendo la especie *A. hybridus* L. var. hortícola de cultivo más extendido y difundido y han sido motivo de estudios sobre preparaciones realizadas en laboratorio (con métodos culinarios tradicionales) para su evaluación nutricional y de apetecibilidad.

La utilización práctica de los subproductos de un cultivo, después de la obtención del grano, proporciona valor agregado al mismo. Los subproductos del cultivo de amaranto granífero incluyen los tallos con ramas y hojas, así como también la inflorescencia sin grano. Ambas fracciones han sido objeto de estudio y los resultados mostraron que han sido útiles como forraje para rumiantes y la inflorescencia como ingrediente en concentrados para aves.

Patachini, Scoles y Covas (Fac. Cienc. Extas. y Nat., UNLPam. y Est.. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa [47] señalaron la posible utilización de la "granza" que deja la trilla una vez retirada la semilla, de dos especies de amarantos graníferos (*A. mantegazzianus* cv. Don Juan y *A. cruentus* cv. Don Guiem). De los resultados obtenidos en el análisis de composición química destacan la superioridad de *A. mantegazzianus* (mayor contenido en fibra cruda, proteína y minerales) que lo valorizan.

Hasta aquí he hecho un repaso de lo realizado sobre composición química, valor nutritivo y utilización del grano y del follaje de especies cultivadas de amaranto de mayor difusión en nuestro país. De todos ellos es posible derivar algunas recomendaciones en el marco de los sectores público y privado.

Corresponde ahora considerar su futuro y para ello nada mejor que remitirme a las Conclusiones que surgieron del "II° Simposio Nacional de Cultivos Estratégicos de Valor Alimenticio: Quinoa y Amarantos" (28-30/4/1992, S. S. de Jujuy, Arg., Univ. Nac. de Jujuy, Secret. Cienc. y Téc. de la Nación) y a la publicación que hiciera la Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, sobre "Perspectivas del Cultivo de los Amarantos en la República Argentina", Publ. Misceláneas N° 13, julio de 1994 [48], de la versión del Informe que presentara el Ing. Agr. G. Covas para una "Mesa Redonda del 1er. Congreso Internacional del Amaranto" (22-27/9/1991, México), en la que merece destacarse:

La consolidación de la Asociación Internacional de Amarantos, como forma de integrar inter-institucionalmente aspectos científicos, tecnológicos, educativos y de difusión de manera orgánica y la intervención de Organismos Estatales de Salud, Educación, etc., dada la significación nutricional de estos cultivos.

El futuro promisorio de los amarantos en la Argentina se fundamenta en la gran extensión del área apta para su cultivo, que abarca no menos de 5 millones de hectáreas sin desplazar a otras actividades agropecuarias, situadas principalmente en la región semiárida del país, al norte de la Patagonia. Por tratarse de un nuevo cultivo, del que no existe aún mercado interno, a pesar de los intentos realizados, no es aventurado predecir que en un plazo no muy lejano de los amarantos graníferos y hortícolas figurarán entre los principales cultivos alimenticios del país.

Cabe destacar, que el Ministerio de Salud y Acción Social aprobó la inclusión de los Amarantos graníferos en el Código Alimentario Argentino por Res. N° 80 del 13 de enero de 1994[48].

## REFERENCIAS


1. C. MORÓN, *Cultivos Autóctonos Subexplotados con Valor Nutricional de Mesoamérica,* Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Sgo. de Chile, 1990, p. 1-10.
2. R. A. PÉREZ RIVERA, *Cultivos Autóctonos Subexplotados con Valor Nutricional de Mesoamérica,* Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Sgo. de Chile, 1990, p. 43-54.
3. S. VALIENTE, T. BOJ Y F. ESPINOSA, *Enseñanza de Nutrición en Agricultura - Un enfoque multidisciplinario, FAO* Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Div. Política Alimentaria y Nutrición, 2da. Ed., Unidad 11, 1988, p. 125-132.
4. M. E. TAPIA, *Cultivos Andinos Subexplotados y su Aporte a la Alimentación,* FAO Oficina Regional para América Latina y el Caribe, 1990, p. 67-69.
5. F. CÁRDENAS Y F. PÉREZ-GIL, *Cultivos Autóctonos Subexplotados con Valor Nutricional de Mesoamérica,* Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Sgo. de Chile, 1990, p. 79-85.
6. G. COVAS, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 1, 1989, p. 1-2; *Amarantos - Trabajos breves,* Comentarios bibliográficos, Resúmenes, Crónicas, Cte . Ed. Est. Exptal. Agrp. Anguil, INTA, (La Pampa) y Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 18, 1995.
7. G. COVAS, *Quid,* Ed. Conceptum S. A., Bs. As., N° 1, 1982, p. 405.
8. M. A. EL SHARKAWY, R. S. LOOMIS Y W. A. WILLIAMS, J. Appl. Ecol., vol. 5, 1968, p. 243-251.
9. G. COVAS, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 4, 1990, p. 7-8.
10. M. H. BERTONI, R. G. GÓMEZ, P. CATTÁNEO Y G. COVAS, *An. Asoc. Quím. Argent.,* vol. 72, 1984, p. 391-397.
11. A. M. SELDES, M. H. BERTONI, P. CATTÁNEO Y G. COVAS, *An. Asoc. Quím. Argent.,* vol. 75, 1987, p. 91-94.
12. M. H. BERTONI, R. G. GÓMEZ, P. CATTÁNEO Y G. COVAS, *An. Asoc. Quím. Argent.,* vol. 72, 1984, p. 597-605.

13. G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cts. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 6, 1991, p. 6.
14. R. Bressani y col., *J. Sci. Food Agric.,* vol. 38, 1987, p. 347.
15. R. M. Saunders and R. Becker, *Advances in Cereal Sci. and Tech.,* vol. VI, cap. 6, Ed. Y. Pomeranz, AA. CC., St. Paul, Minn. USA, 1984, p. 357-396.
16. G. Bresler, G. Vaamonde and S. Brizzio, *Int. J. Food Microbiol.,* vol. 13, 1991, p. 75-80.
17 G. Bresler, S. Brizzio and G. Vaamonde, *Int. J. Food Microbiol.,* vol. 25, 1995, p. 101-108.
18. M. H. Bertoni, P. Cattáneo y G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 17, 1994, p. 8-10.
19. J. Vaquero y T. M. Sánchez, *Amaranto - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 7, 1991, p. 7.
20. P. Cattáneo, M. H. Bertoni, G. Covas y A. Seldes, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 3-4, 1992, p. 1719.
21. R. M. de Troiani y T. E. Sánchez, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 1, 1989, p. 3.
22. T. Balasubramanian y S. Sadasivam, *Plant Foods for Human Nutrition,* vol. 39, 1989, p. 325-330; ver: El Amaranto y su Potencial, Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 3, 1990, p. 13.
23. M. Avellano, N. Luquez, G. Sconamillo,y S. Mucciarelli, *Amaranto - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 3, 1990, p. 1-2.
24. M. O. Ologunade, A. O. Akiyemiju, S. . R. A. Adewusi, O. A. Afolabi, R. L. Shepard y O. L. Oke, Tropical Afric. (Trinidad and Tobago), vol. 69, 1992, p. 106-110. ver: *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2-3-4,. 1991, p. 15.
25. A. Castillo, M. Abreu, M. Hernández, J. González y J. Reboso, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani,. Guatemala, Bol. N° 1-2, 1993, p. 12-15.
26. M. Tassone y A. Fignol, *Amarantos - Novedades e Intormaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Est. Exptal. Agrop. Anvil, INTA, La Pampa, Bol. N° 14, 1994, p. 4-5.
27. G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 10, 1992, p. 8.
28. R. G. Gómez, M. H. Bertoni y G. Covas, *An. Asoc. Quím. Argent.,* vol. 74, 1986, p. 333-338.
29. D. Prakash and M. Pal, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2, 1990, p. 7-12.
30. R. Bressani, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2, 1990, p. 4.
31. D. Prakash, M. Pal, G. P. Srivastava, B. D. Joshi y P. K. Jha, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 3-4, 1993, p. 11-13.
32. O. A. Siliquini y H. Pagella, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam, Bol. N° 4, 1990, p. 5-6.
33. P. Cattáneo, M. H. Bertoni, A. Pereyra Gonzáles y G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 17, 1994, p. 6-8.
34. G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam, Est. Exptal. Agrop. Angsil, INTA, La Pampas Bol. N° 17, 1994, p. 12.
35. P. Cattáneo, M. H. Bertoni y G. Covas, *Amarantos - Trabajos breves,* Comentarios bibliográficos, Resúmenes, Crónicas, Cte. Ed. Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 18, 1995, p. 15.
36. G. Covas, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam, Est. Exptal-Agrop-Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 14, 1993, p. 9.
37. S. H. Pattacini, G. E. Scoles y G. Covas, *Amarantos - Trabajos breves,* Comentarios bibliográficos, Resúmenes, Crónicas, Cte. Ed. Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Fac. Agr. UNTPam., Bol. N° 18, 1995, p. 4-6.
38. E. Acevedo y L. Velásquez-Coronado, *El Amaranto y su Potencial;* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2-3-4, 1991, p. 7-9.

39. R. BRESSANI Y V. BENAVIDES, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 4, 1990, p. 14-18.
40. C. C. SANTIN, J. MORALES, L. IBÁÑEZ Y S. M. LAZCANO, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2, 1988, p. 8-11., ver: *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam, Bol. N° 1, 1989, p. 5.
41. S. M. LASCANO, L. J. MORALES Y N. N. RICO, *El Amaranto y su Potencial;* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 2, 1988, p. 11-13, ver: *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam., Bol. N° 1, 1989, p. 6.
42. W. M. BREENE, *Amaranto: Perspectives on Production, Processing and Marketing,* Minn. Extension Service, Univ. Of Minn., Agriculture, USA, August 23-25, 1990, p. 75-95.
43. A. SÁNCHEZ-MARROQUÍN, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R Bressani, Guatemala, Bol. N° 2-3-4, 1991, p. 5-7.
44. R. M. DE TROIANI Y G. COVAS, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNIPam. Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 5, 1990, p. 5.
45. L. Sumar Kalinowski, *"El pequeño gigante", Programa Nacional de la Kiwicha,* UNICEF, Perú, Publ. UNICEF-LIMA, 1° Ed., p. 23.
46. G. GUPTA Y S. SEHGAL, *El Amaranto y su Potencial,* Ed. R. Bressani, Guatemala, Bol. N° 3-4, 1992, p. 11-13.
47. S. H. PATTACINI, G. E. SCOLES Y G. COVAS, *Amarantos - Novedades e Informaciones,* Cte. Ed. Fac. Agr. UNLPam, Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, Bol. N° 14, 1993, p. 34.
48. G. COVAS, *Perspectivas del Cultivo de los Amarantos en la República Argentina,* Publ. Misceláneas N° 13, Est. Exptal. Agrop. Anguil, INTA, La Pampa, 1994, p. 1-10.

ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA, VOLUMEN 227 - NÚMERO ESPECIAL, 1997 (21 - 34)

# LA TEORIA DEL ESCALADO DINAMICO APLICADO AL CAMBIO DE SUPERFICIES SOLIDAS

*R. C. Salvarezza y A. J. Arvia*

Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA).
Sucursal 4, Casilla de Correo 16, (1900) La Plata, Argentina.

## RESUMEN

La dinámica de la superficie de un sólido durante el crecimiento y la desintegración de la fase se puede estudiar mediante una secuencia de imágenes obtenida por microscopía de efecto túnel (STM) o de fuerzas atómicas (AFM) aplicando la teoría de escalado dinámico. Esta teoría provee información sobre la cinética y el mecanismo relacionado con la evolución de la topografía, conocimentos básicos para predecir la estabilidad de superficies sólidas. La teoría del escalado dinámico ofrece una descripción cuali- y cuantitativa de las irregularidades superficiales en régimen estacionario y no estacionario. En este trabajo se describe la aplicación de la teoría del escalado dinámico al estudio de superficies sólidas y se muestran varios ejemplos a través de los cuales se descubre un comportamiento universal de los sistemas materiales.

## 1. INTRODUCCION

En condiciones de presión y temperatura ambiente, la descripción de la superficie de un sólido es muy compleja. Los dominios cristalográficamente bien definidos en términos de los índices de Miller sencillos están generalmente restringidos a áreas muy pequeñas como resulta de la aplicación de las nanoscopías de barrido. Frecuentemente, las superficies sólidas observadas a diferentes resoluciones muestran irregularidades tales como escalones, rincones, límites de grano, presencia de adsorbatos, etc. [1, 3]

El problema de las irregularidades superficiales aparece siempre en la catálisis heterogénea, particularmente cuando se intenta conocer el área real y la actividad de un catalizador para un dado proceso, dos aspectos importantes relacionados con su eficiencia específica. Esto signifi-

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

ca que el conocimiento de la topografía y de la estructura superficial de los catalizadores sólidos a los niveles del µm y del nm, respectivamente, reviste importancia para muchas cuestiones, entre ellas para predecir el comportamiento desl sistema en diferentes condiciones de operación, identificar estructuras de absorbatos relacionados con posibles mecanismos de reaccción [1], y optimizar la catálisis heterogénea. Estos conocimientos son también de importancia en la fabricación de nanoestructuras y dispositivos electrónicos. Los avances tecnológicos en esta dirección dependen del grado de contralor alcanzado en el proceso de crecimiento, en la calidad de la superficie del sólido, y en su topografía. Consecuentemente, es esencial comprender los fenómenos microscópicos ligados a la evolución de la superficie y su morfología final. Para abordar estas cuestiones se requiere un enfoque interdisciplinario con conocimientos de física, química, matemática y técnicas computacionales.

Procesos tales como la formación de fases sólidas desde fase vapor [4], el crecimiento epitaxial inducido por rayos [5], la electrodeposición metálica [6] y la desintegración de una fase sólida, como ocurre en la corrosión de materiales [7], involucran siempre una interfaz dinámica. La forma como se desplaza la interfaz refleja el tipo de cinética que obedece el sistema y el mecanismo dominante en el proceso [8].

El movimiento de la interfaz se puede describir con las mismas herramientas que son empleadas para procesos aparentemente diferentes, tales como el flujo de líquidos en medios porosos, la propagación de frentes de llamas, el crecimiento de colonias de bacterias o la ruptura de dieléctricos [8]. El rasgo común de estos fenómenos es la existencia de una superficie irregular y móvil. Para una interfaz de este tipo se intenta determinar el mecanismo de su formación y sus características dinámicas [8, 10]. La evaluación de estas características es importante para conocer la estabilidad de la interfaz móvil, sea una interfaz sólido/líquido o sólido/gas, usando técnicas que perturban mínimamente al sistema, y pueden ser aplicadas independientemente de la naturaleza de aquél.

## 2. EL CONCEPTO DE ESCALADO. MODELOS ALEJADOS DEL EQUILIBRIO

El concepto de escalado fue introducido en el estudio de interfaces móviles por Family y Vicsek (1985) [11, 12] para analizar la topografía de sistemas fuera del equilibrio. Este concepto es parte de una cuestión más amplia que se refiere a la geometría fractal, y es aplicable a sistemas reales dentro de límites de escala en los cuales se manifiesta la naturaleza estocástica del proceso. El escalado, así planteado, elude aspectos microscópicos del sistema tales como su estructura reticular discreta y la formación de salientes.

La aplicación del concepto de escalado es posible a sistemas cuyo comportamiento responde tanto a modelos continuos como discretos. En general, la evolución de la interfaz irregular está gobernada esencialmente por dos contribuciones competitivas, una relacionada con el aumento de la rugosidad y otra vinculada al alisamiento superficial [8]. La contribución al aumento de la rugosidad se atribuye, según el caso, al ruido estocástico de las partículas que llegan a la interfaz y se incorporan a la fase en crecimiento, o a la naturaleza aleatoria de los procesos de disolución o destrucción de fases. Por otro lado, el alisamiento resulta de la participación de diferentes procesos de relajamiento entre los cuales puede jugar un papel importante la difusión superficial de las partículas en la superficie, procesos de adsorción/desorción de las partículas, etc.

Para homo- y heterodeposición de fases sólidas se han desarrollado modelos de crecimiento discretos y continuos. Para estos últimos se plantea una ecuación diferencial que se puede integrar, siendo los más utilizados los modelos propuestos por Edwards y Wilkinson [13], Kardar, Parisi y Zhang [14], Wolf y Villain [15], y Lai y Das Sarma [16].

# 3. BREVE DESCRIPCION DE LA TEORIA DEL ESCALADO DINAMICO

Según la teoría del escalado dinámico, las características discretas del material depositado conduce a la formación de una interfaz irregular. Sea el crecimiento de un objeto de longitud L. La teoría predice que el ancho de la interfaz, W(L, t), es decir la desviación standard de las alturas en la superficie del sólido (Fig. 1), al tiempo t, está dada por

$$W(L, t) = (1/N \sum [h(x_i) - < h >]^2)^{1/2} \qquad [1]$$

mientras que la dependencia temporal y espacial de W(L, t) obedece a la siguiente ecuación

$$W(L, t)^2 = L^{2\alpha} f(t/L^z) \qquad [2]$$

donde $h(x_1)$ representa la altura del depósito medida en el punto $x_i$; <h> es la altura promedio, f es una función de $t/L^z$; $\alpha$ es el exponente de la rugosidad, y z representa la ley de escalado.

Para $L \rightarrow 0$, o $t \rightarrow \infty$, la ecuación [2] se reduce a

$$W(L) = L^{\alpha} \qquad [3]$$

La ecuación [3] corresponde al régimen de rugosidad estacionario que se alcanza para $t >> t_x$, siendo $t_x$ el tiempo que define la transición del régimen de rugosidad no estacionario al estacionario.

Por otra parte, para $L \rightarrow \infty$, o $t \rightarrow 0$, la ecuación [2] resulta:

$$W(t) = t^{\beta} \qquad [4]$$

La ecuación [4] representa el régimen de rugosidad no estacionario válido para $t << t_x$, siendo ß el exponente de crecimiento de la rugosidad. Los exponentes $\alpha$ y ß se vinculan con z por la relación $z = \alpha/\beta$.

La figura 2 muestra un esquema de la evolución de una superficie en crecimiento donde aparecen los regímenes de rugosidad no estacionario y estacionario. Del análisis de estos perfiles se pueden evaluar los exponentes antes mencionados. El esquema también muestra la evolución

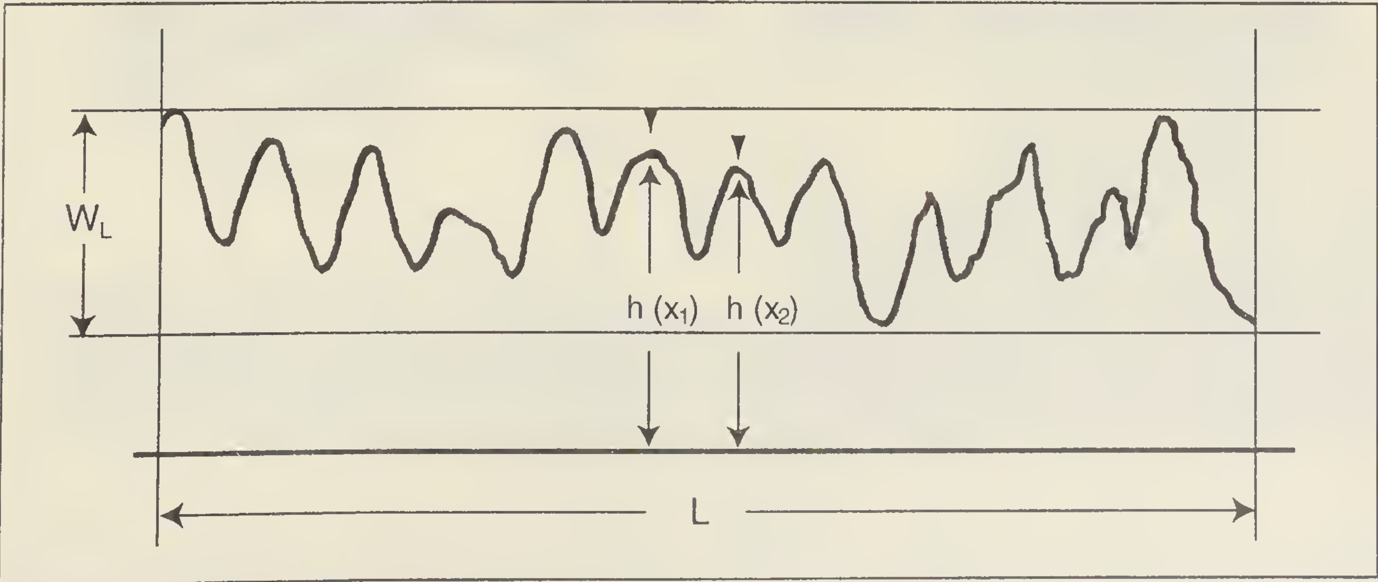



**Figura 1:** Esquema de un perfil rugoso al tiempo t, indicando los parámetros experimentales empleados en el análisis mediante el escalado dinámico. Se indican las alturas del perfil en las posiciones $x_1$ y $x_2$.

del perfil de una superficie durante el decaimiento de la rugosidad. La determinación de α, β y z y su comparación con las predicciones de los diferentes modelos de crecimiento provee información acerca de los procesos microscópicos responsables de la evolución de la superficie irregular [8, 9, 12].

## 4. MODELOS CINETICOS FUERA DEL EQUILIBRIO

Los modelos que describen la evolución de perfiles irregulares se pueden agrupar en modelos discretos y modelos continuos. Los primeros consideran la evolución del sistema a nivel atómico, es decir, a longitudes comparables a las de los retículos cristalinos sencillos. Los segundos valen para longitudes o tamaño mayores [8].

### 4.1 Modelos discretos

Ente los modelos discretos más sencillos, el modelo de Eden [17] admite que cada partícula que llega a la superficie se pega en el primer sitio de contacto, y los sitios vecinos se transforman en posibles sitios de crecimiento. En todos los casos el sitio de crecimiento se elige al azar. El objeto formado es compacto, con una masa no fractal y una superficie irregular que puede ser descripta como un fractal autofin [12].

En el modelo balístico (Fig. 3 a, b) las partículas llegan a la superficie describiendo trayectorias lineales. También, en este caso, cada partícula que arriba a la superficie se pega en el primer sitio de contacto. El depósito así formado presenta una masa porosa, no fractal, y una superficie fractal autofin. Los resultados de estos dos modelos, obtenidos por simulación Monte Carlo, indican la existencia de una correlación dependiente de L, a lo largo del perfil de la superficie. Esta correlación resulta del tamaño finito de las partículas que se depositan. De estos modelos resultan $\alpha = 0{,}33$ y $\beta = 0{,}25$, para un crecimiento tridimensional (3d) [8].

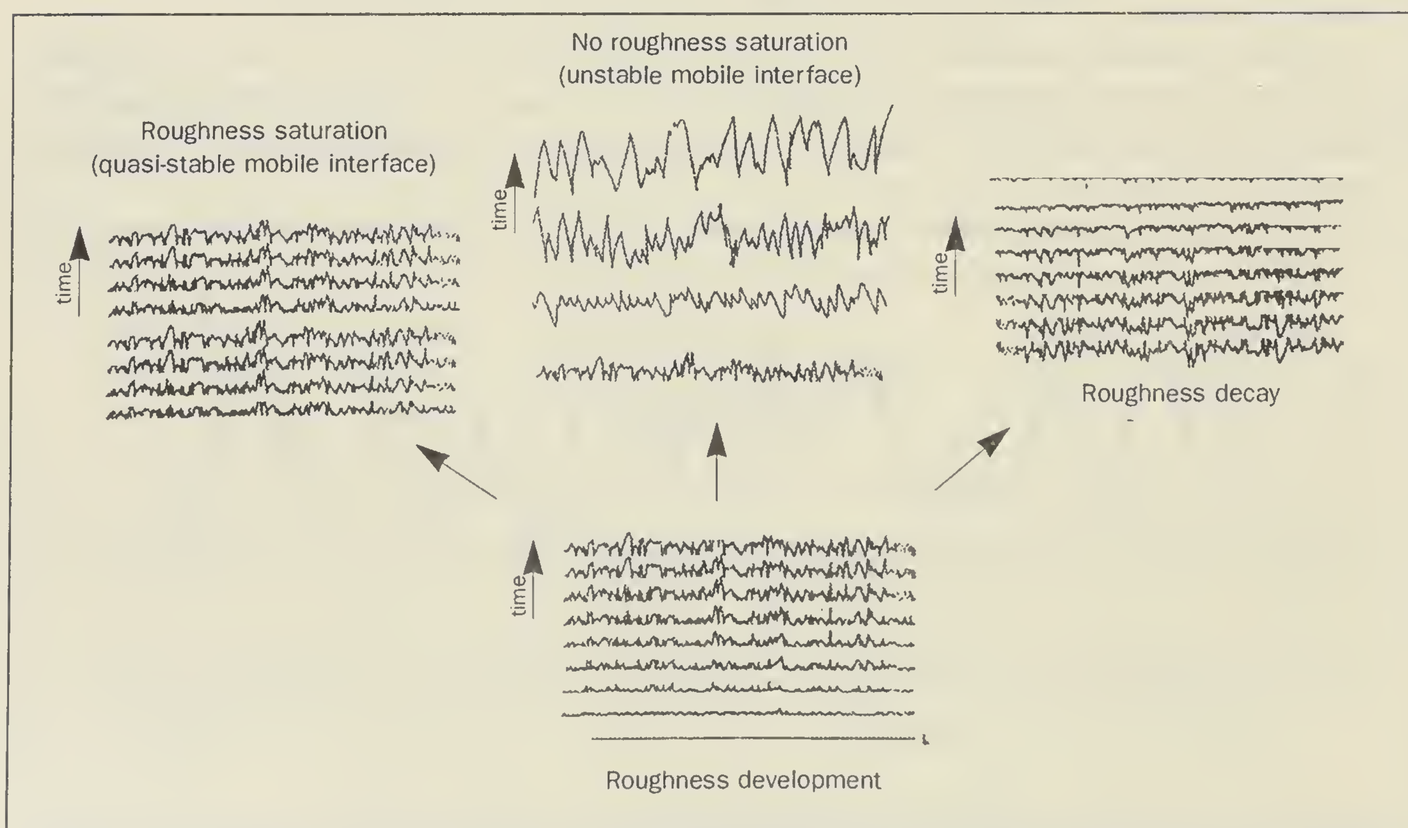



**Figura 2:** Esquemas de la evolución de perfiles rugosos. Se muestran situaciones de saturación, no saturación y decaimiento de la rugosidad.

En otro modelo de depósitos formados al azar [8] (Fig. 4), las partículas se incorporan al primer sitio más profundo que encuentran en la dirección de su desplazamiento hacia la superficie. El mecanismo de "pegado" involucrado en este modelo conduce a un régimen de rugosidad no estacionario en el cual el valor de W aumenta linealmente con la raíz cuadrada del tiempo, resultando entonces $\beta = 1/2$ para cualquier dimensión topográfica [12].

La inclusión de la difusión superficial en el modelo de depósitos formados al azar [15] implica la posibilidad que la partícula se desplace una cierta distancia sobre la superficie aumentando, en general, su número de coordinación (Fig. 5). En este caso, para un proceso que se desarrolla en un espacio 3d, $\alpha = 1$ y $\beta = 0{,}25$. Por otra parte, cuando la difusión superficial es completa la superficie tiende a una superficie lisa con valores $\alpha = 0$ y $\beta = 0$ en el espacio 3d [13].

## 4.2 Modelos continuos

Los modelos continuos plantean una ecuación para el movimiento de la interfaz que está basada en la ecuación de Langevin[12]. Para una interfase irregular esta ecuación establece que la velocidad local para el crecimiento de la altura de la interfaz está dada por

$$\frac{\partial h\,(x,\,t)}{\partial t} = \eta(x,\,t) \qquad [5]$$

donde el término $\eta\,(x,\,t)$ representa el ruido estocástico de las partículas finitas que llegan a la interface. La resolución de la ecuación [5] lleva a un régimen de rugosidad no estacionario e implica $\beta = 0{,}50$ en cualquier dimensión. Esta ecuación describe correctamente procesos de deposición donde la única contribución es el ruido estocástico.

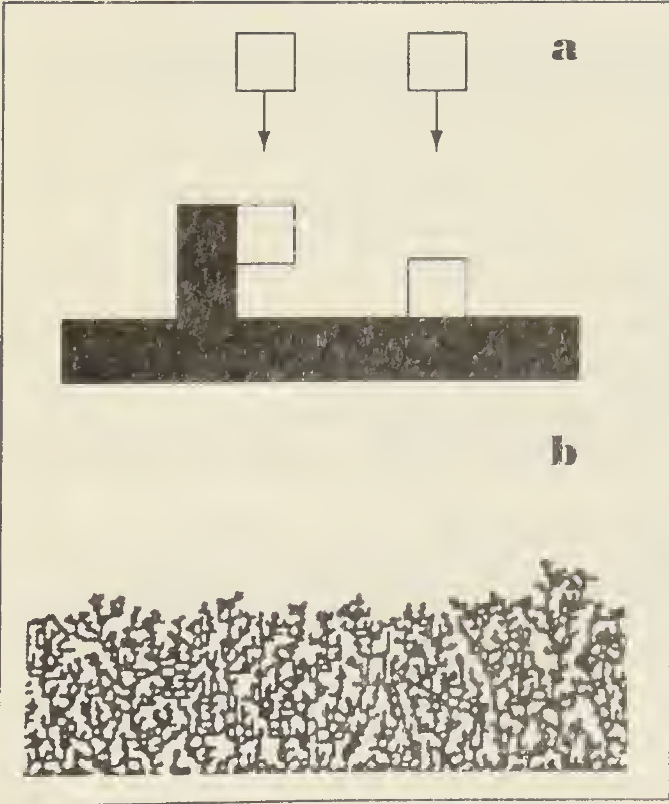



**Figura 3:** Esquemas mostrando el movimiento (a) de partículas que terminan incorporándose a la superficie de la fase en crecimiento, según el modelo balístico; (b) el perfil resultante.

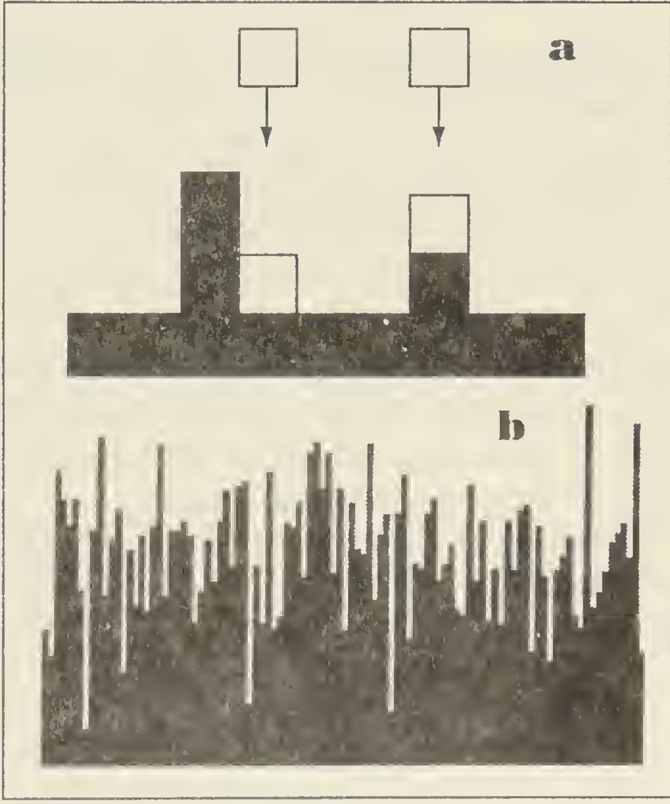
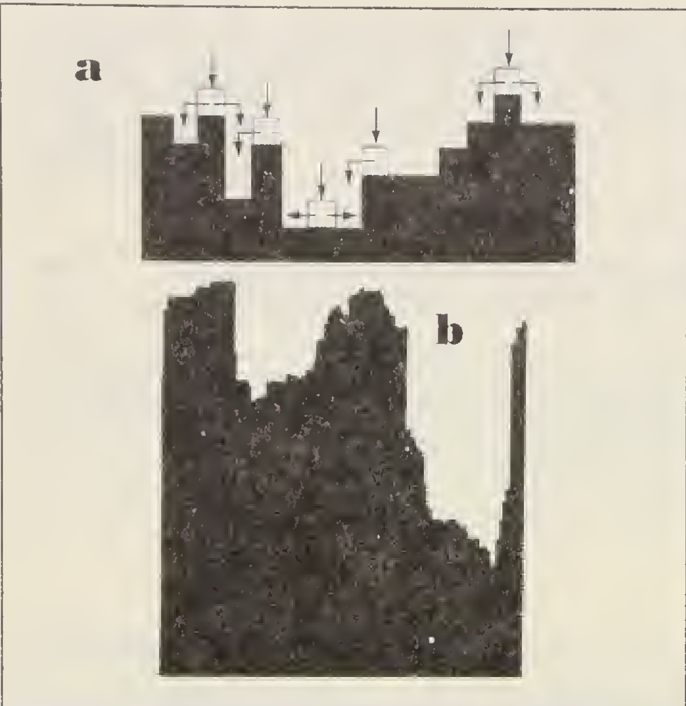



**Figura 4:** Esquemas mostrando el movimiento (a) de partículas que terminan incorporándose a la superficie de la fase en crecimiento, según el modelo de depósitos formados al azar; (b) el perfil resultante.



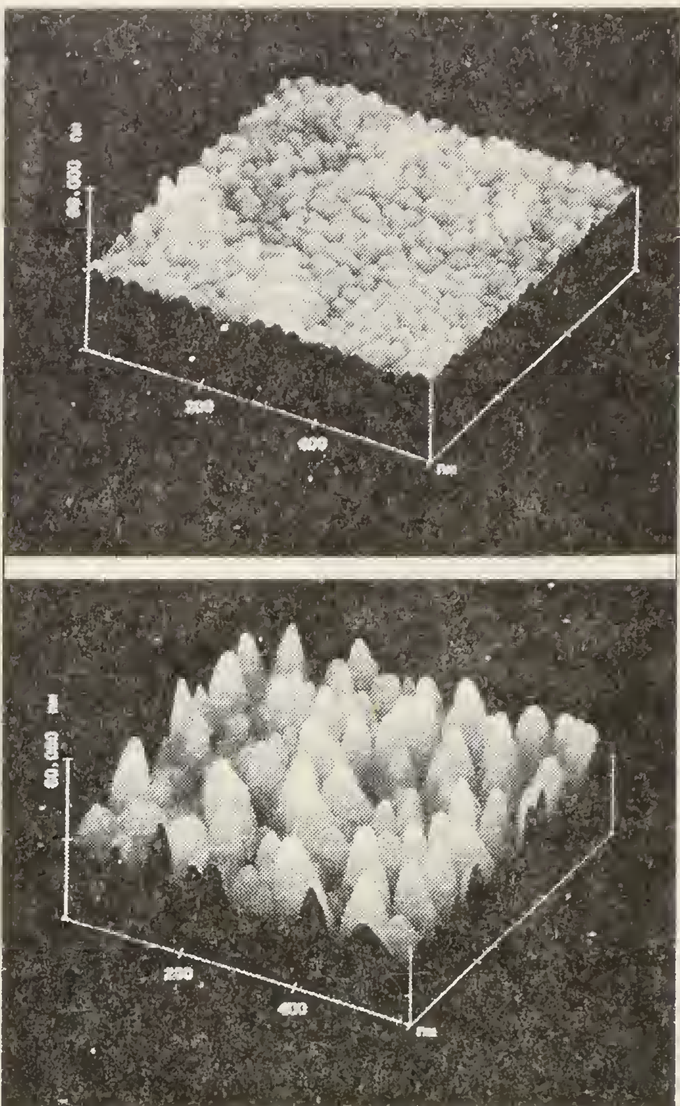



**Figura 5:** Esquemas mostrando el movimiento (a) de partículas que terminan incorporándose a la superficie de la fase en crecimiento, según el modelo de depósitos formados al azar con relajación superficial; (b) el perfil resultante.
**Figura 6:** Imágenes STM mostrando el desarrollo de una superficie de oro irregular producida por evaporación sobre un substrato de vidrio plano. Espesor promedio de la película (a) 27 nm; (b) 1140 nm.

Otra expresión para la velocidad de crecimiento del ancho de la interfaz es la de Edwards y Wilkinson [13].

$$\frac{\partial h\,(x,t)}{\partial t} = \nu\nabla^2 h + \eta(x,t) \qquad [6]$$

El primer término tiene en cuenta el efecto de alisamiento producido por fenómenos de adsorción/desorción. La constante $\nu$ se denomina habitualmente coeficiente de tensión superficial generalizado. Resolviendo la ecuación lineal [6] para un espacio 3d se obtienen $\alpha = 0$ y $\beta = 0$, es decir, los mismos parámetros previstos por el modelo atomístico de depósitos formados al azar con difusión superficial completa.

La ecuación propuesta por Kardar, Parisi y Zhang[14] incorpora a la ecuación [6] el término no lineal $(\lambda/2)\,(\nabla h)^2$ que tiene en cuenta efectos laterales en el crecimiento de la interfaz. la ecuación de movimiento resulta:

$$\frac{\partial h\,(x,t)}{\partial t} = \nu\nabla^2 h + \frac{\lambda}{2}\,(\nabla h)^2 + \eta(x,t) \qquad [7]$$

Para un crecimiento en el espacio 3d, la ecuación [7] conduce a $\alpha \cong 0{,}38$ y $\beta \cong 0{,}25$, parámetros también previstos por los modelos atomísticos de depósitos balísticos[12] y de Eden[17].

En el modelo lineal de Wolf y Villain[15], el fenómeno de alisamiento es debido exclusivamente a la difusión superficial. La ecuación de movimiento de la interfaz es:

$$\frac{\partial h\,(x,t)}{\partial t} = -K\,\nabla^4 h + \eta(x,t) \qquad [8]$$

siendo K una constante que incluye al coeficiente de difusión superficial.

El primer término de la ecuación [8] conduce a un régimen de alisamiento no estacionario de rugosidad, que está implícito en la ecuación de difusión de Fick[18], y el segundo término opera en el fenómeno de arrugosado. La resolución de la ecuación [8] en el espacio 3d lleva inicialmente a $\alpha = 1$ y $\beta = 1/4$, mientras que a tiempos largos la interfaz se torna inestable con valores de $\beta > 1/2$.

Lai y Das Sarma agregaron a la ecuación [8] un término que incorpora las interacciones laterales[16], resultando

$$\frac{\partial h\,(x,t)}{\partial t} = -K\,\nabla^4 h + \lambda\nabla^2(\nabla h)^2 + \eta(x,t) \qquad [9]$$

Para un espacio 3d, en los primeros estadios de crecimiento, la ecuación [9] establece $\alpha = 1$ y $\beta = 1/4$, y para $t \rightarrow \infty$, $\alpha = 2/3$ y $\beta = 1/5$.

Resumiendo, la determinación de los exponentes $\alpha$ y $\beta$ a partir del análisis de la evolución de la interfaz ofrece la posibilidad de conocer el mecanismo dominante tanto en la formación como en la destrucción de una fase sólida, particularmente en condiciones alejadas del equilibrio.

## 5. APLICACION DE LA TEORIA DEL ESCALADO DINAMICO A SISTEMAS REALES

El desarrollo de diversas nanoscopías de barrido principalmente la microscopía de efecto túnel (STM) y la de fuerzas atómicas (AFM) [19], ofrece la posibilidad de aplicar la teoría del escalado dinámico a superficies sólidas desde la escala atómica en adelante, pues estas microscopías proveen imágenes en espacio y tiempo real. Además, la amplitud de escala cubierta por las mismas, del orden del nanómetro hasta el milímetro, permite probar la validez tanto de los modelos de crecimiento continuos como de los discontinuos y establecer el rango de escala correspondiente.

### 5.1 El crecimiento de películas sólidas

El crecimiento de una película de oro sobre una superficie lisa de vidrio a 298 K producida desde la fase vapor a la velocidad de 0,2 nm $s^{-1}$, conduce a estructuras columnares (Fig. 6) policristalinas con una orientación cristalográfica preferida.

La topografía de estos depósitos obtenida por STM y analizada en base a la teoría del escalado dinámico, muestra dos comportamientos diferentes que dependen del tamaño de escala, es decir de L. Si $L < d_s$, donde $d_s$ es el diámetro promedio de las columnas, resulta $\alpha = 0{,}90 \pm 0{,}06$ y $\beta$ (I) = 0,25 ± 0,06, mientras que para $L > d_s$ se obtiene $\alpha$ (II) = 0,37 ± 0,05 y $\beta$ (II) = 0,45 ± 0,06. Los valores de los exponentes $\alpha$ (I) y $\beta$ (I) coinciden con los previstos por los modelos lineales de crecimiento basados en la ecuación [8]. Por lo tanto, la evolución de la topografía dentro de la columna está dominada por la difusión superficial de los átomos metálicos. Por su parte, los exponentes $\alpha$ (II) y ß (II), que resultan a escalas mayores que $d_s$, describen las fluctuaciones de altura de las columnas durante el crecimiento global de la fase. El valor de $\alpha$ (II) se acerca a las predicciones de la ecuación [7] en la cual los efectos laterales

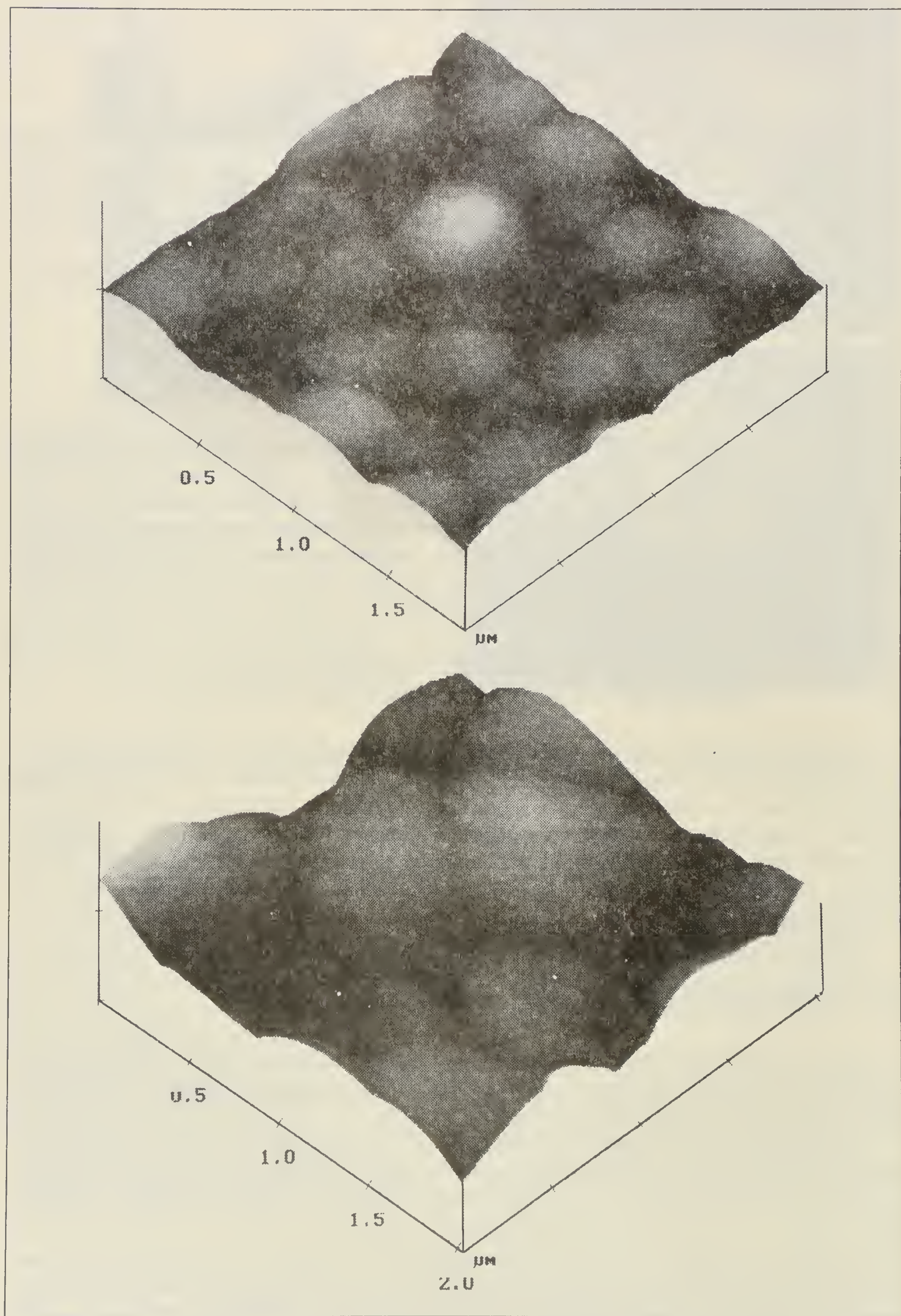



**Figura 7:** Imágenes AFM mostrando el desarrollo de una superficie de polianilina (polímero conductor) producida por electropolimerización de anilina sobre un substrato liso de platino. Espesor promedio de la película (a) 228 nm; (b) 700 nm.

juegan un papel importante aunque el valor del exponente $\beta$ (II) es significativamente mayor.

El análisis de las estructuras columnares de oro producidas a 298 K por electroreducción de óxidos de oro conduce a resultados similares $\alpha$ (I) = 0,90 ± 0,06, $\beta$ (I) = 0,31 ± 0,08 y $\alpha$ (II) = 0,49 ± 0,05, $\beta$ (II) = 0,51 ± 0,08 [6]. Estos valores indican que la evolución de la topografía para depósitos electroquímicos es similar a la descripta para películas de oro producidas por depósitos formados desde la fase vapor.

La secuencia de imágenes de AFM durante la formación de películas de polímeros conductores sobre metales nobles [20] muestra también el desarrolllo de una superficie irregular a medida que aumenta el espesor de la película depositada (Fig. 7). Estas películas presentan una estructura compacta, rugosa, constituida por unidades globulares y huecos ramificados. El estudio de las imágenes de estas películas electrodepositadas en medios acuosos ácidos, a 298 K, conduce a los valores $\alpha$ (I) = 0,90 ± 0,06, $\beta$ (I) = 0,4 para $L > d_s$, y $\alpha$ (II) = 0,4, $\beta$ = 0.6 para $L > d_g$ siendo $d_g$ el tamaño promedio de los elementos globulares que constituyen la película. El valor $\beta$ (II) > 0,5 para longitudes de escala mayores del tamaño medio de glóbulo indica la presencia de una superficie inestable debida a la distribución no uniforme del campo eléctrico durante el crecimiento del polímero. Esta inestabilidad conduce finalmente al desarrollo de estructuras ramificadas [21].

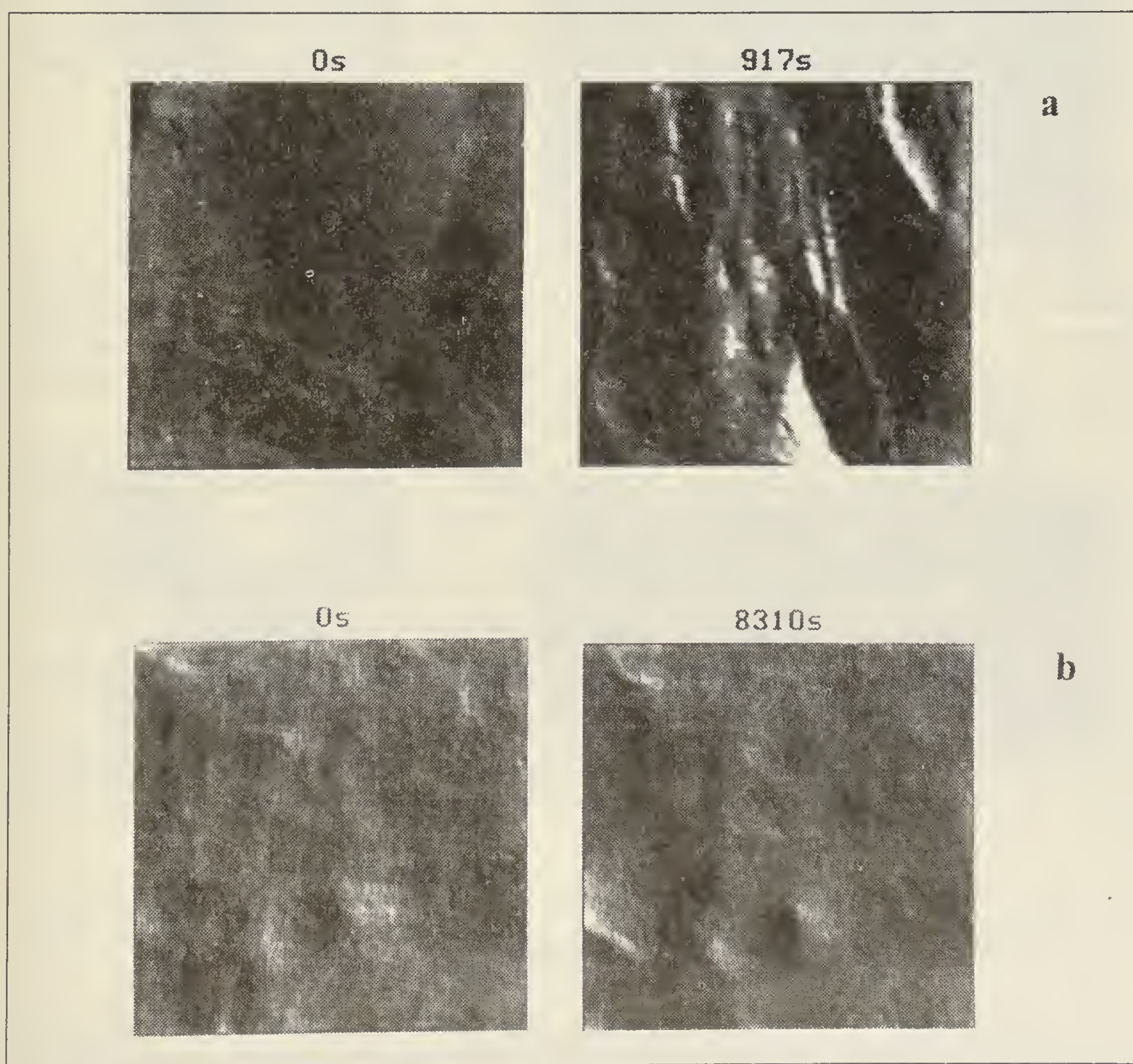



**Figura 8:** Secuencia de imágenes STM in situ de la superficie de un electrodo de plata sumergido en 1 M $HClO_4$ a 298 K, a densidades de corriente 4 μA $cm^{-2}$ (a) y 30 μA $cm^{-2}$ (b).

## 5.2 Destrucción de fases

La electrodisolución de metales en medios conductores implica la separación de partículas del sólido y la creación de agujeros. El proceso global conlleva el desarrollo de irregularidades en la interfaz. Este tipo de procesos ha sido investigado aplicando el escalado dinámico o muestras de plata [7], cobre [22] y latones [23].

### *5.2.1 Electrodisolución de plata*

A baja densidad de corriente ($j < 15\ \mu A\ cm^{-2}$) la electrodisolución de plata tiene lugar por un mecanismo de capa por capa el cual no produce cambios de rugosidad (Fig. 8b). Contrariamente, a $j > 15\ \mu A\ cm^{-2}$, la electrodisolución está acompañada por un aumento de rugosidad (Fig. 8a). En este caso, el análisis de la topografía conduce al valor $\alpha = 0{,}90$, previsto por la ecuación [8], y al valor $\beta = 0{,}36$, que excede ligeramente el valor previsto por la misma. Esta diferencia sugiere que en la electrodisolución de plata, donde aparece una fuerte contribución de la difusión superficial de átomos, el transporte de masa entre terrazas está restringido por una barrera de Schwoebel [24] localizada en los escalones la cual conduce a una exaltación del desarrollo de la rugosidad. Estos resultados confirman las conclusiones de medidas electroquímicas previas sobre la cinética de la electrodisolución de plata en medios acuosos donde la difusión superficial es el paso determinante del proceso de disolución.

### *5.2.2 Electrodisolución de cobre*

Experiencias similares a la electrodisolución de plata se realizaron para la electrodisolución de cobre en medios ácidos [22]. En condiciones de circuito abierto ($j = 0$), la superficie de este metal resulta extremadamente móvil, ya que la topografía observada secuencialmente por STM muestra la desaparición de pequeños "pits" que están inicialmente presentes en la superficie metálica. Esto produce un pequeño decrecimiento de la rugosidad.

La electrodisolución de cobre a $j = 6\ \mu A\ cm^{-2}$ es más complicada. En este caso el ataque se produce generando dominios facetados de baja rugosidad y cavidades profundas denominadas "etched pits". Los dominios facetados y de baja rugosidad se comportan de manera comparable al caso de la plata. El valor de $\beta = 0{,}36$ que resulta para estos dominios muestra el papel importante que juega la difusión superficial con barreras Schwoebel en las primeras etapas de la electrodisolución de Cu, probablemente una difusión superficial anisotrópica.

Los dominios en los cuales se observan "etched pits" crecen con el tiempo y terminan dominando el comportamiento global del sistema, incluyendo el desarrollo de área activa. En este caso, el valor $\beta > 1$ indica que la superficie es altamente inestable y no alcanza un estado estacionario. La inestabilidad estaría relacionadas con efectos no locales provenientes de un campo difusional no homogéneo en la zona de reacción o anisotropía en la velocidad de electrodisolución.

## 5.3 El decaimiento espontáneo del área superficial

La difusión superficial es uno de los procesos de relajación que opera en el decaimiento de la superficie de un metal a temperatura ambiente. Esto se puede verificar estudiando el decrecimiento del área activa de superficies metálicas con estructuras columnares, tales como superficies rugosas de Au, Pt, Pd, en contacto con una disolución electrolítica [25]. En estos casos, las

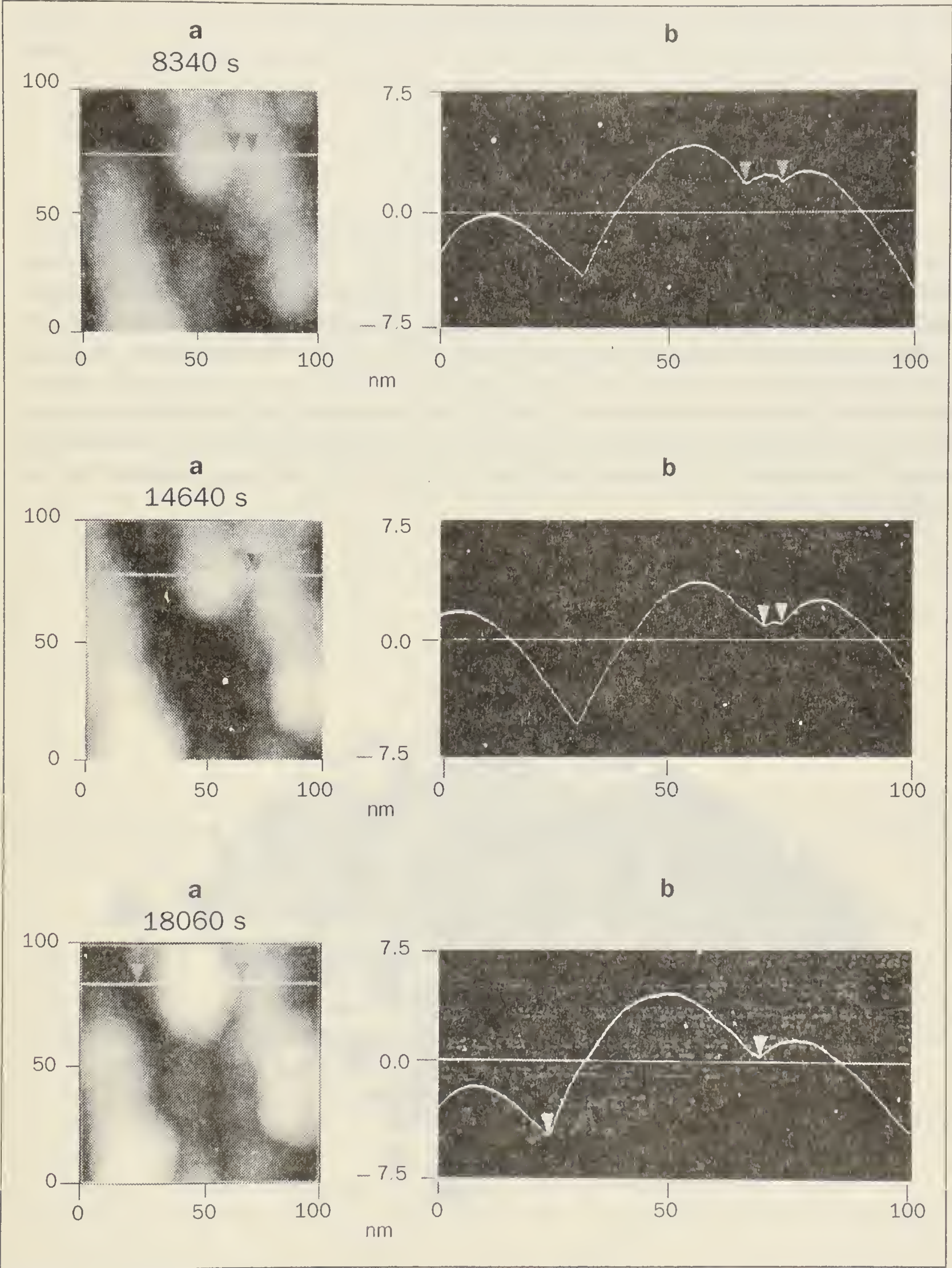



**Figura 9:** Secuencia de imágenes STM in situ de un electrodo de oro de estructura columnar sumergido en 0.5 M $H_2SO_4$ + 0.1 M NaCl; E = 0.6 V (vs. electrodo de calomel saturado) a T = 298 K. El cambio del radio de las partículas se mide en la dirección x en función del tiempo.

columnas más pequeñas, del tamaño promedio de pocos nm, desaparecen mientras que las más grandes crecen a expensas de aquellas (Fig. 9). El seguimiento de este proceso por nanoscopía de barrido permite determinar el radio de las partículas en función del tiempo. La ley de creci-

miento de las columnas es de la forma $r \approx t^x$ con $x = 1/4$. El valor de z confirma que la difusión superficial de átomos juega un papel dominante en el proceso de crecimiento similar al previsto por la ley de Ostwald para la maduración de coloides.

## 5.4 Superficies catalíticamente activas y fractalidad

Las superficies metálicas con estructura columnar de Pd, Pt y Au, muestran propiedades catalíticas mejores que la de los metales lisos para algunas reacciones de interés en catálisis heterogénea (Fig. 10). Esta exaltación de las propiedades catalíticas se correlaciona con el comportamiento no-euclideano de las superficies involucradas en aquellas estructuras, hecho que se demuestra midiendo su dimensión fractal, que resulta ser $D_s = 2{,}57$ [26]. Prácticamente, esto significa una gran parte de los átomos de la fase sólida tienden a ubicarse en la superficie estructurada en forma de columnas de tamaño promedio de algunos nanómetros. Se produce así un aumento de las propiedades catalíticas en dos direcciones, creciendo significativamente el área del sustrato, y decreciendo el número de coordinación promedio de los átomos metálicos que participan en el proceso.

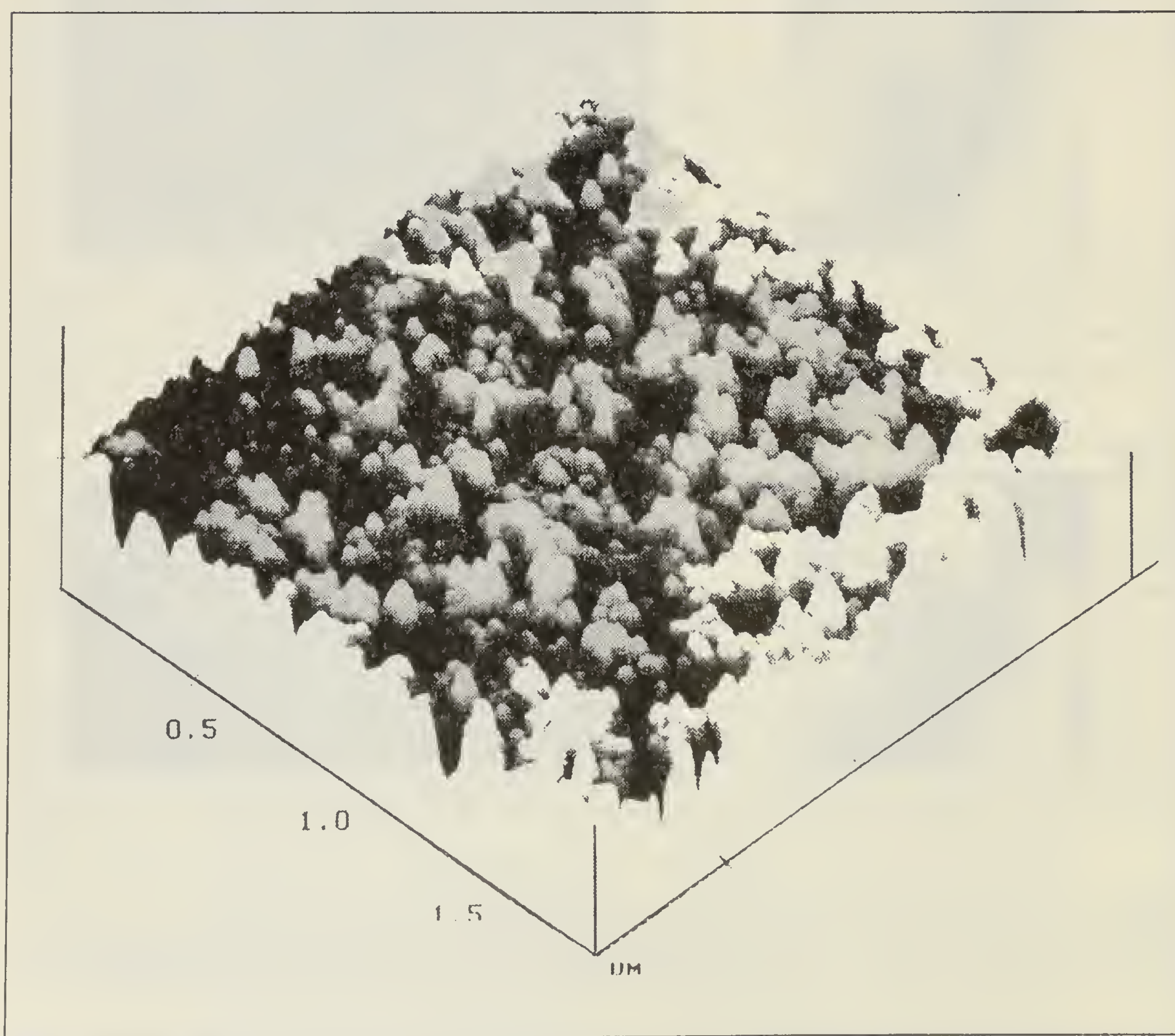



**Figura 10:** Imagen AFM ex situ de una superficie de Pd de estructura columnar producido por electroreducción de óxido de Pd. La dimensión fractal de la superficie se determinó utilizando los métodos que se describen en la literatura [26].

## 6. CONCLUSIONES

- El método del escalado dinámico y la geometría fractal son herramientas importantes para estudiar la dinámica interfacial en relación con procesos heterogéneos en superficies sólidas y determinar la calidad de películas delgadas de interés en nanotecnología y microelectrónica.
- El análisis mediante escalado dinámico puede ser aplicado con ventajas a imágenes de superficies obtenidas por STM y AFM, puesto que esas imágenes muestran la topografía en espacio real.
- El desarrollo de la rugosidad abarca regímenes de crecimiento no estacionario y estacionario. En el régimen estacionario solamente se puede evaluar el parámetro $\alpha$, mientras que cuando existen los dos regímenes de crecimiento, se pueden determinar los parámetros $\alpha$, $\beta$, y z.
- El escalado dinámico aplicado al crecimiento de nanopartículas permite evaluar el parámetro z.
- Los parámetros $\alpha$, $\beta$ y z dan información sobre los procesos microscópicos que dominan la evolución de la superficie de sólidos durante procesos de crecimiento y disolución.
- La difusión superficial de átomos y moléculas, deducida en forma indirecta en cinética química, se puede demostrar en forma concluyente a través del estudio de imágenes STM y AFM mediante el escalado dinámico.
- La existencia de una superficie fractal puede explicar datos experiementales que, desde el punto de vista de los modelos clásicos, se los considera anómalos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con apoyos económicos del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## REFERENCIAS


1. Somorjai, G. I., *Chemistry in Two Dimensions: Surfaces;* Cornell University Press; Ithaca (1981).
2. Behm, R. J., en *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods;* Behm, R. J.; García, N.; Rohrer, H.; Eds.; Kluwer; Doordrecht (1990).
3. Godréche, C., Ed.; *Solids far from Equilibrium;* Cambridge University Press; Cambridge (1992)
4. Vázquez, L.; Salvarezza, R. C.; Herrasti, P.; Ocón, P.; Vara, J. M., Arvia, A. J.; *Surf. Sci.* 1996, 345, 17.
5. Ernst, H. J.; Fabre, F.; Folkerts, R.; Lapoujoulade, J.; *Phys Rev. Lett.* 1994, 72, 112.
6. Vázquez, L.; Salvarezza, R. C.; Herrasti, P.; Ocón, P.; Vara, J. M.; Arvia, A. J.; *Phys. Rev. B* 1995, 52, 2032.
7. Vela, M. E.; Andreasen, G.; Hernández Creus, A.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J.; *Phys. Rev. B* 1996, 53, 10217.
8. Barabási, A. L.; Stanley, H. E.; *Fractal Concepts in Growth Phenomena;* University Press, Cambridge (1995).
9. Vicsek, T.; *Fractal Growth Phenomena;* World Scientific, Singapore (1989).
10. Bunde, A.; Havlin, S.; Eds.; *Fractals and Disordered Systems,* 2nd. edition, Springer, Berlin (1995).
11. *Dynamics of Fractal Surfaces;* Family, F.; Vicsek, T., Eds.; World Scientific; Singapore (1991).
12. Family, F.; *Physica* 1990, 168A, 561, and references therein.

13. EDWARDS, S. F.; WILKINSON, D. R.; *Proc. Roy. Soc.* London A 1982, 381, 17.
14. KARDAR, M.; PARISI, G.; ZHANG, Y. C.; *Phys. Rev. Lett.* 1986, 56, 889.
15. WOLF, D.; VILLAIN, J.; *Europhys. Lett.* 1990, 13, 389.
16. LAI, Z. W.; DAS SARMA, S.; *Phys. Rev. Lett.* 1990, 13, 389.
17. EDEN, M.; en *Proceeding of the 4th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability;* Neyman, F.; Ed.; University of California Press; Berkeley (1961), Vol. 4.
18. LEVICH, V.; *Physicochemical Hydrodynamics;* Prentice-Hall; Englewood Cliffs (1962).
19. SALVAREZZA, R. C.; ARVIA, A. J.; *Modern Aspects of Electrochemistry;* Conway, B. E.; Bockris, J. O'M.; White, R. E.; Eds.; Penum Press; New York, (1996), Vol. 28, Chap. 5, p. 289.
20. VELA, M. E., ANDREASEN, G., SALVAREZZA, R. C., ARVIA, A. J.; *J. Chem. Farad. Trans.* 1996, 92, 4093.
21. AVNIR, D.; Ed.; *The Fractal Approach to the Heterogeneous Chemistry*, Wiley, Chichester (1989).
22. AZIZ, S. G.; VELA, M. E.; ANDREASEN, G.; SALVAREZZA, R. C.; ARVIA, A. J.; *Electrochim. Acta,* en prensa.
23. *Morales, J.; Esparza, P.; González, S.; Vázquez, L.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J.; Langmuir,* 1996, 12, 500.
24. Schwoebel, R. R.; J. *Appl. Phys.* 1968, 40, 614.
25. Andreasen, G.; Nazzarro, M.; Ramírez, J.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J.;*J. Electrochem. Soc.* 1996, 143, 466.
26. KESSLER, T.; VISINTIN, A.; BOLZÁN, A. E.; ANDREASEN, G., SALVAREZZA, R. C.; TRIACA, W. E.; ARVIA, A. J.; *Langmuir*, 1996, 12, 6587.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (35 - 39)

# EVOLUCION DEL CONTROL QUIMICO DE LOS INSECTOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

*Eduardo N. Zerba*

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
Zufriategui 4380 - 1603 Villa Martelli - Prov. de Buenos Aires - Argentina

## INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas, descubierta en 1909, es una patología muy particular. Existe sólo en el continente americano y su incidencia se extiende desde México hasta la Argentina[1]. La enfermedad es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido vectorialmente por chinches hematófagas de la familia *Reduviidae*[2]. Además de la transmisión vectorial, la enfermedad de Chagas reconoce otras vías de infección como son principalmente la transfusional y la transplacentaria. Indudablemente la vía de infección entomológica es la de mayor importancia y requiere de la convergencia del agente etiológico, del insecto vector y del hospedero animal o humano, en un contexto favorable. Ese contexto resulta óptimo en toda la zona rural continental de Latinoamérica, donde además de los actores principales de la enfermedad se dan las condiciones geográficas y socioeconómicas ideales para perpetuar la endemia. Así es como entre 16 y 18 millones de habitantes de latinoamérica están infectados y alrededor de 100 millones, la cuarta parte de la población total, está en riesgo de contraer la enfermedad [3]. No hay tratamientos disponibles para las formas crónicas de la enfermedad. El nifurtimox, un derivado nitrofuránico, y el benznidazol, un nitroimidazol, son las únicas 2 drogas utilizadas para el tratamiento de casos agudos de la enfermedad. Lamentablemente su eficacia es muy variable, probablemente por variaciones en las cepas locales de parásitos [3] y además su toxicidad en mamíferos [4] da lugar a riesgos que quizás no han sido suficientemente evaluados.

Debido a las características de la Enfermedad de Chagas, las pobres respuestas terapéuticas y la falta de perspectivas de contar con una vacuna en el corto plazo, la alternativa de lu-

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

cha contra la endemia está centrada en el mejoramiento de vivienda, la educación sanitaria y el control de los vectores [5]. De estas 3 últimas alternativas, la que ha tenido mayor continuidad y éxito en toda Latinoamérica en general y en la Argentina en particular es el tratamiento de viviendas y sus peridomicilios con insecticidas sintéticos [5]. En la Argentina durante 1983 se rociaron con insecticidas menos de 100.000 y la incidencia de la enfermedad medida en soldados conscriptos, se situaba en alrededor del 5%. En 1993 y en una actividad creciente de tratamientos con insecticidas, el número de viviendas rociadas fue de alrededor de 900.000 viviendas y la incidencia de la endemia, medida en forma similar que en 1983, fue ligeramente mayor al 1% [3]. Pero no sólo ha habido en la Argentina un esfuerzo sostenido para extender los tratamientos de control domiciliarios y peridomiciliarios, sino que también hubo una notable evolución en el tipo de compuestos químicos utilizados y en la forma en que los mismos fueron formulados.

## INSECTICIDAS ORGANOCLORADOS

En la década del '40, el dietildicloro difeniltricloroetano (DDT), insecticida sintético de amplio espectro, había conseguido resonantes triunfos en el control de artrópodos de importancia médica, como el *Anopheles quadrimaculatus,* transmisor de la malaria [6]. Dado el auge del DDT y su éxito en el control del mosquito vector de malaria, este insecticida descubierto por Paul Müller en Suiza en 1939 [6], se adoptó inicialmente para los primeros intentos de lucha organizada contra las chinches hematófagas transmisoras de la Enfermedad de Chagas. Sorpresivamente el DDT no fue una alternativa exitosa para el control de redúvidos. Posteriormente, se establecieron 2 causas entomotoxicológicas de la pobre efectividad del DDT para el control de vectores de la Enfermedad de Chagas. A principios de la década del '60, el grupo del Dr. Agosin en Chile estableció la presencia de caminos metabólicos glutatión y NADPH dependientes en *Triatoma infestans*, principal vector en el cono sur latinoamericano. Estas vías metabólicas transforman el DDT a DDE y keltane en biotransformaciones detoxificantes mediadas por 2 enzimas, una DDT dehidroclorinasa y una DDT hidroxilasa [7, 8, 9]. Posteriormente, nuestro laboratorio estableció que ninfas II de *Triatoma infestans* ayunadas son muy tolerantes al DDT. Se demostró que esta tolerancia se debe fundamentalmente a la muy lenta velocidad de penetración del tóxico a través del integumento del insecto [10]. En condiciones de ayuno de las ninfas está desfavorecida la accesibilidad de insecticidas a las membranas intersegmentales, zonas preferenciales de penetración de compuestos liposolubles al insecto [11].

Luego del inesperado fracaso del DDT en el control de vectores de la Enfermedad de Chagas y en una época en la que el mercado de los insecticidas estaba dominado por los hidrocarburos clorados, la opción fue el hexaclorociclohexano. Este compuesto se produce por la cloración del benceno y da lugar a 5 isómeros de acuerdo a la conformación del anillo y las posiciones de los cloros respecto al plano del mismo. Estos 5 isómeros se denominan $\alpha$, $\beta$, $\gamma$, $\delta$ y $\varepsilon$ y en el producto técnico denominado HCH se encuentran en proporciones variables [12]. El isómero $\gamma$ comúnmente llamado lindano está en una concentración en el HCH que varía entre el 8 y el 15%. El lindano presenta un efecto insecticida mucho mayor que el resto de los isómeros [12]. Para *Triatoma infestans* se observó que el lindano es el único isómero del HCH que presenta efecto insecticida (D'Agostino, B. y Zerba, E.; Resultados no publicados).

El HCH comienza a ser usado a partir de 1947 cuando se establece su efecto insecticida sobre insectos vectores de la Enfermedad de Chagas [13]. En Venezuela las acciones de control sobre el principal vector de la Enfermedad de Chagas de la región (*Rhodnius prolixus*) se encararon con otro insecticida organoclorado, el dieldrin que fue introducido en 1949 como consecuencia del fracaso del DDT[13].

## INSECTICIDAS ANTICOLINESTERASICOS

Hacia fines de la década del '60 y como consecuencia de los serios cuestionamientos toxicológicos y ecotoxicológicos originados principalmente en Estados Unidos y Europa se inicia el reemplazo de los insecticidas organoclorados por insecticidas antilinesterásicos, significativamente menos persistentes en el medio. Este tipo de compuestos se caracterizan por ser inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima clave en la transmisión del impulso nervioso. Este efecto es la lesión bioquímica primaria, causante de la toxicidad de estos compuestos, tanto en antrópodos como en vertebrados[12]. Los insecticidas anticolinesterásicos están constituidos por dos familias diferentes, los organofosforados y los carbamatos. Durante la década del '70 estos insecticidas son ampliamente utilizados en Latinoamérica en la lucha contra la Enfermedad de Chagas. En la Argentina los más ampliamente utilizados fueron el malatión, el fenitrotión y el propoxur. Ensayos de laboratorio de estos compuestos y otros anticolinesterásicos demostraron su efectividad insecticida sobre *Triatoma infestans*[14]. En la Tabla 1 se resumen valores de Dosis Letal 50% de varios compuestos anticolinesterásicos. La inhibición de la acetilcolinesterasa de cabeza de *Triatoma infestans* como cuasa de muerte del insecto intoxicado fue estabelcida en nuestro laboratorio[15]. Asimismo se estableció el efecto ovicida de algunos de estos compuestos y la inhibición de la acetilcolinesterasa de embrión fue medida en huevos tratados [16].

Muchas críticas se hicieron a estos compuestos debido a que muchos de ellos presentan una toxicidad aguda elevada en mamíferos [12]. No obstante la considerable seguridad de uso de los compuestos anticolinesterásicos seleccionados para usos sanitarios en general y para control de vectores de la Enfermedad de Chagas en particular, los cuestionamientos toxicológicos generales a las familias de fosforados y carbamatos apresuraron su reemplazo por insecticidas más modernos.

## INSECTICIDAS PIRETROIDES

Hacia fines de la década del '70 se mide por primera vez la eficacia insecticida de un compuesto piretroide sobre una especie de la familia *Reduciidae*. La obtención de la DL 50 de la deltametrina en *Triatoma infestans* en 1978 abrió un nuevo panorama en el uso de insecticidas para el control de redúvidos transmisores de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica [14]. Trabajos posteriores demostraron la existencia de un grupo de insecticidas piretroides, especialmente cianopiretroides, de excepcional efecto insecticida sobre los vectores de la Enfermedad de Chagas (Tabla 2) [17, 18]. Asimismo se estableció que este tipo de compuestos variaba su toxi-

**TABLA 1:** Dosis letal 50% de insecticidas anticolinesterásicos medidas en ninfas V de *Triatoma infestans*

| Compuesto | Familla | DL 50* (µg/g) |
|---|---|---|
| malatión | fosforado | 32,0 |
| fenitrotión | fosforado | 5,6 |
| pirimifos metilo | fosforado | 12,8 |
| propoxur | carbamato | 18,5 |
| bendiocarb | carbamato | 20,0 |

* Dosis letal 50% obtenida por aplicación tópica.

**TABLA 2:** DL 50 de piretroides en ninfas V de *Triatoma infestans*.

| Piretroide | DL 50* (ng/insecto) | Intervalos de confianza del 95% |
|---|---|---|
| deltametrina | 215 | (135 - 349) |
| b-cipermetrina | 219 | (10 - 609) |
| alfametrina | 1250 | (640 - 2450) |
| cipermetrina | 2510 | (1380 - 4550) |

* Aplicación tópica según protocolo OMS.

cidad sobre el insecto vector en forma negativa respecto a la temperatura. Es decir que a temperaturas más altas, en términos generales su efecto insecticida es menor[19]. Actualmente casi todas las campañas de control de vectores de la Enfermedad de Chagas que se realizan en Latinoamérica se basan en la utilización de insecticidas piretroides. Los compuestos que se aplican son la deltametrina, la λ-cihalotrina, la β-cipermetrina, la β-ciflutrina y la cipermetrina. Los cuatro primeros corresponden a lo que se dio en llamar piretroides de 3ra. generación y que tienen en común el haber sido enriquecidos en los isómeros más efectivos como insecticidas. Estos compuestos han permitido alcanzar una considerable seguridad de uso y por lo tanto disminuir el impacto toxicológico del control de vectores de la Enfermedad de Chagas.

## EVOLUCION FUTURA DEL CONTROL QUIMICO

Es difícil prever posibles alternativas de control químico de vectores de la Enfermedad de Chagas que puedan en el futuro cercano reemplazar el uso de los piretroides. Los inhibidores de crecimiento, como los juvenoides, si bien han mostrado alta efectividad sobre *Triatoma infestans* [20] no son considerados una herramienta práctica de control de Chagas fundamentalmente porque su modo de acción no produce un control rápido de la población de insectos. Por tal razón no hay una interrupción de la transmisión de la enfermedad en el corto plazo luego de los tratamientos.

En la actualidad, una de las líneas más promisorias de innovación en el control de redúvidos vectores es el desarrollo de nuevas formulaciones y formas de aplicar los productos. En este sentido, los potes fumígenos insecticidas y las telas impregnadas con piretroides para uso como cielorrasos, han sido incorporadas como herramientas de control de los vectores de Chagas y han permitido una innovación estratégica fundamental: incorporar a la población en riesgo en las acciones de desinsectación [21]. En los últimos años han cobrado importancia los estudios de control químico de redúvidos vectores a través de la modificación del comportamiento del insecto. El efecto bloqueante de reactivos de -SH sobre la alimentación y la cópula de *Triatoma infestans* ha sido establecido y estudiado en sus posibilidades de control poblacional [22, 23]. Este tipo de compuestos actúan a nivel de la recepción sensorial del insecto, donde la presencia de compuestos con grupos sulfhidrilos libres es crítica para la recepción de las claves olfatorias que desencadenan los procesos de alimentación y de cópula. Presumiblemente el tripéptido glutatión podría ser el blanco primario molecular sobre el que actuarían los reactivos de -SH en los receptores sensoriales de *Triatoma infestans* y que culminaría con el efecto antialimentario y anticópula observado [24].

Actualmente las emisiones volátiles de *Triatoma infestans* cuando se permite el encuentro

entre adultos de ambos sexos han demostrado contener un compuesto o mezclas de compuestos con un marcado efecto feromonal como desencadenador del proceso de cópula (A. Fontán y E. Zerba, resultados no publicados).

La identificación y posterior síntesis del o de los compuestos activos como fenómenos sexuales de los vectores de la Enfermedad de Chagas sin duda abrirá nuevas posibilidades de control químico altamente selectivo y de bajo impacto ambiental.

## AGRADECIMIENTO

Mi especial reconocimiento al Dr. Pedro Cattáneo, quien fuera mi Director de Tesis y un ejemplo de vida.

## REFERENCIAS

1. WHO. *Control of Chagas Disease. Report of a WHO expert Committe.* WHO Technical Report Series 811: 95, Ginebra, 1991.
2. Zeledón, R. and Rabinovich, J. E. 1981. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 101-133.
3. WHO. *Tropical Disease Research. Highlights 1993-1994.* Twelfth Programme Report of the UNDP-/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). World Health Organization. Ginebra, 1995.
4. Castro, J. and Díaz de Tortanzo, E. 1988. *Biomed. Environ. Sci.* 1: 19-33.
5. Zerba, E. 1989. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 24-29.
6. Mellanby, K. 1992. *The DDT story.* The British Crop Protection Council.
7. Agosin, M.; Morello, A. and Scaramelli, N. 1964. *J. Econ. Entomol.* 57: 974-977.
8. Dinamarca, M.; Agosin, M. and Neghme, A. 1962. *Exp. Parasitol.* 12: 61-72.
9. Ilivivky, J.; Dinamarca, M. and Agosin, M. 1964. *Comp. Biochem. Physiol.* 11: 391-401.
10. Fontán, A. and Zerba, E. 1992. *Comp. Biochem. Physiol.* 101c: 589-591.
11. Fontán, A. and Zerba, E. 1987. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 4: 313-323.
12. O'Brien, R. D. 1967. *Insecticides. Action and metabolism.* Academic Press, 1967.
13. Gualtieri, J; Nelson, M. y Cichero, J. 1985. *Presente y perspectiva del control químico.* En: Carballo, R.; Rabinovich, J. y Tonn, R. (Eds.): Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas, Vol. II. Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social, Argentina.
14. Zerba, E; de Licastro, S. A.; Wood, E. y Picollo de Villar, M. I., 1987. *Insecticides: mechanism of action.* En: R. Brenner and A. Stoka (Eds.) Chagas Disease vectors: an ecological, anatomic, physiological, biochemistry and control study. CRC Press.
15. Wood, E.; Zerba, E.; Picollo, M. I. and de Licastro, S. A., *Insect. Biochem.* 9: 595-601.
16. Picollo de Villar, M. I.; Wood, E.; Zerba, E. and de Licastro, S. A. 1980. *Comp. Biochem. Physiol.* 67c: 55-59.
17. Casabé N.; Melgar, F.; Wood, E. y Zerba, E. 1988, *Insect. Scia. Appl.* 9: 233-236.
18. Zerba, E. 1988. *Rev. Arg. Microbiol.* 20: 32-38.
19. Alzogaray, R. and Zerba, E. 1996. *J. Med. Entomol.* 33: 598-62.
20. Picollo de Villar, M. I.; Seccacini, E. and Zerba E. 1987. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 313-323.
21. Zerba, E. 1995. *Public Health Magazine (Bayer)* 12: 62-71.
22. Picollo, M. I.; Seccacini, E.; Vassena C. y Zerba, E. 1993. *Acta Trop.* 52: 297-307.
23. Vassena, C.; Picollo, M. I. and Zerba, E. 1996. *J. Med. Entomol.* 33: 823-825.
24. González Audino, P.; Masuh, H.; de Licastro, S. A.; Vassena, C; Picollo, M. I. y Zerba, E. *Pestic. Sci.* 49: 339-343.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, (41 - 54)

# TREATMENT OF CHEMICALLY INDUCED FREE RADICAL MEDIATED CELL INJURY

*José A. Castro and Gerardo D. Castro*

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX) - CITEFA/CONICET
Zufriategui 4380, 1603 Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina

## ABSTRACT

Intoxications are just the consecuence of cell injury induced by chemicals. Cell injury is every perturbation departing the cell from its normal cellular homeostasis. If the cell is able to restore equilibrium, not necessary in the point of the normal one but just in other still compatible with its integrated activity, the cell would result reversibly damaged but will survive. If it does not succeed to do it, the cell will die and the damage would be lethal. Free radicals are thought to be involved in many toxic processes, from oxidative stress and tissue aging to carcinogenesis. These reactive moieties interact with biomolecules, resulting in impaired metabolic pathways and altered cell structures. To understand how free radicals harm cells, the study of the model system $CCl_4$ versus liver has been very useful and it is discussed here. This hepatotoxin requires biotransformation to $\bullet CCl_3$ and $CCl_3O_2\bullet$ free radicals in a cytochrome P450-mediated process to be toxic.

## RESUMEN

Las intoxicaciones son simplemente las consecuencias de algún daño a nivel celular inducido por sustancias químicas. Se entiende por daño celular toda perturbación que aparte a la celula de su homeostasis normal. Si esta es capaz de restablecer el equilibrio, no necesariamente en el punto normal pero si en otro todavía compatible con su actividad integrada, la célula resultará dañada reversiblemente y sobrevivirá. Si no tiene éxito en esto, morirá y el daño habrá

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

sido letal. Se adjudica a los radicales libres un papel relevante en muchos procesos tóxicos, desde el estrés oxidativo y el envejecimiento de los tejidos hasta la carcinogenesis. Estas partículas reactivas interaccionan con biomoléculas, produciendo alteraciones sobre mecanismos metabólicos y sobre estructuras celulares. El sistema modelo de investigación $CCl_4$ versus hígado ha resultado muy útil para entender como los radicales libres dañan las células y en esta revisión es discutido en detalle. Esta hepatotoxina necesita para ejercer su acción dañina la previa biotransformación a radicales libres $\bullet CCl_3$ y $CCl_3O_2\bullet$, en una reacción mediada por el citocromo P450.

## INTRODUCTION AND DEFINITIONS

Before developing the subject matter of this review the need to introduce some definitions was felt necessary. One is related to the concept of cell injury. This is a key issue for today is believed that many pathologies and among them intoxications, are just the consequences of cell injury produced by different noxious agents or circumstances and in the particular case of poisoning, chemicals [1].

Cell injury is every perturbation that departs the cell form the normal celular homeostasis [2]. If the cell is able to restore equilibrium, not necessarily in the point of the normal one but in other still compatible with the cellular integrated activity, the cell would result reversibly damaged but will survive. If it does not succeed to do it, the cell will die and the damage would be lethal [2]. This in turn poses another question: When a cell is dead? The cell is dead when it loses its potential capacity to duplicate and when it loses its inherent capacity for self repair [2]. Of course, in this definition exception should be made for cells such as those from the nervous system which do not duplicate. When a sufficient number of cells of a given organ are damaged, the global function of that organ in the body is harmed and becomes responsible for the symptoms of the poisoning. How serious the poisoning is would depend on the intensity, extension and on the degree of reversibility of the damage on the cells, from the organ or organs involved and of course, from the specific relevance they have for the life of the living being under consideration [1]. As result of this study it results evident that the understanding about how toxics cause cell injury and its characteristics is a central issue in toxicology.

Since in this work only chemicals which produce or are themselves free radicals are going to be analyzed then, a definition of what free radicals are is also mandatory.

Free radical is an atom or molecular structure having an impaired electron (in its outermost orbital) [3-5].

Free radicals are usually very reactive. This reactivity is due to the electronic deficiency they have in the outermost orbital. This is why they are electrophilic and the reason why in their reactions they tend to restore the vacant bond [3-5].

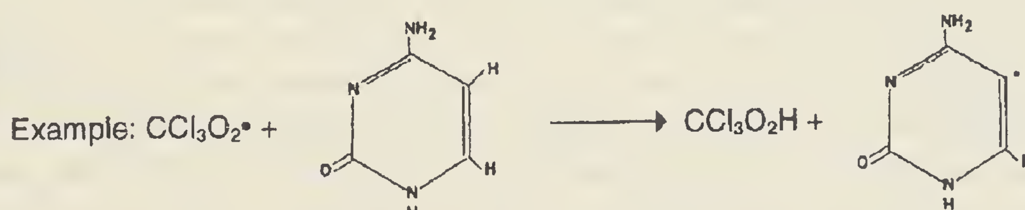
Their exceptional reactivity is responsible for their ability to interact with a variety of molecules which might be in their inmediate neighbourhood or with other free radicals [3-5]. The more relevant reactions of free radicals are: hydrogen (H) abstraction, addition, disproportionation and cancellation (see Figure 1). The most frequently involved with farmacological or toxicological properties of free radicals or free radical forming xenobiotics are, the addition and the H abstraction reactions [3-5]. The former leads to covalent binding of the free radical residue to the cellular component. The latter generates a free radical in the target molecule which may have different consequences according to the involved molecule. In the case of PUFA it results in lipid peroxidation [4]; in the case of cholesterol, oxidation products are formed [6]; in that of nucleic acid bases mostly hydroxylated bases were observed [7-11]. Amino acids give oxidized and broken amino acid products [12-16]. Examples of drugs and other xenobiotics which are themselves or produce free radicals might be found in previous reviews [3-5].

# MODEL SYSTEMS FOR FREE RADICAL INDUCED CELL INJURY. THE $CCl_4$ VERSUS LIVER SYSTEM

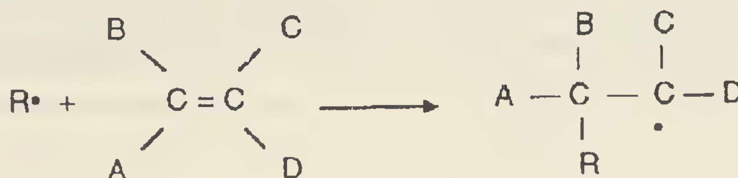
To understand how free radicals harm cells it has been very useful to use what are known as "model systems". The ideal model system should allow to employ a simple chemical able to cause reproducible damage in a very well known cell type. In addition, during biotransformation not too many different products should be generated, so the study of their interactions with cellular components does not become extremely complicate. The most thoroughly studied model system in toxicology has been that constituted by the toxic $CCl_4$ acting on liver hepatocytes [17-23]. In fact, $CCl_4$ is simple and produces a few metabolites. Those which are related to toxic effects are free radicals and that, made of $CCl_4$ a good mode! forfree radical induced cell injury. The hepatocyte selection is also a good one for it is a kind of cell whose structure, biochemistry, chemistry and function is very well known [24; 25]. This is also relevant, for to explain how a chemical alters a cell one needs to know as much as possible, how that cell normally is.

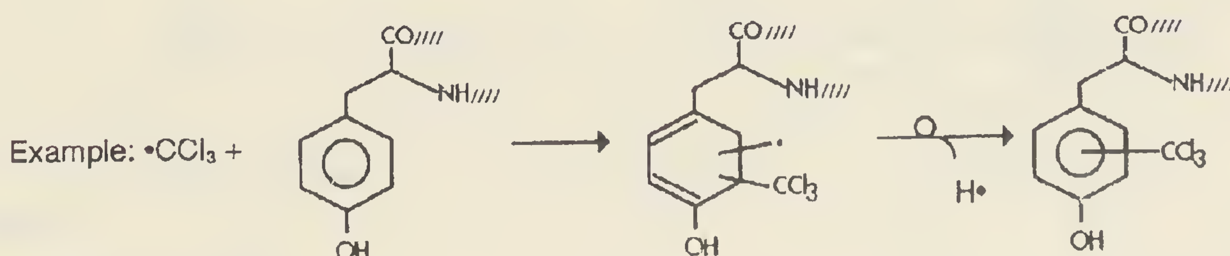
**1) Abstraction (hydrogen abstraction)**




**2) Addition**




**3) Disproportionation**




**4) Cancellation**

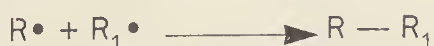



**Figura 1:** Main reactions of free radicals.

# MECHANISM OF $CCl_4$ INDUCED HEPATOCYTE CELL DEATH AND THE SUBSEQUENT LIVER NECROSIS

When hepatocytes are exposed to $CCl_4$ they do not inmediately die. Electron microscopy of the sequence of events sparked when liver is exposed to $CCl_4$ in a poisoned rat reveals that it takes several hours for the cells to die [17; 26]. The sequence of events is described in Table 1 [17;25] and shows that the deleterious process becomes first visible at the endoplasmic reticulum. Later involves the (Giolgi apparatus and the perinuclear membrane and finally reaches to the lysosomes, mitochondria and the inner nuclear compartment (see Table 1 for details). After 12 hours of poisoning some cells are already dead and at 24 hours most liver hepatocytes are dead and necrotic. There are stages of the poisoning process where the cell injury is still reversible (e.g. 6 hours of poisoning). That is, if exposure to $CCl_4$ for some reason ceased, the cell sooner or later would return to normality. Later the process moves to a point of no-return and the cell irreversibly continues through pathways ending in cell death and later in cellular necrosis.

The reason for the early involvement of the endoplasmic reticulum (ER) in liver cell damage by $CCl_4$, is that there is located most of a critical cellular component, the cytochrome P450 which is needed for the $CCl_4$ biotransformation to the actual deleterious agents responsible for damage, the $\bullet CCl_3$ free radicals[18-22]. Depending on the presence or not of oxygen, the $\bullet CCl_3$ give rise to the far more reactive $CCl_3O_2\bullet$ (trichloromethylperoxyl radicals) [18-23]. Both, the $\bullet CCl_3$ and the $CCl_3O_2\bullet$ are the critical initial mediators of all $CCl_4$ deleterious effects [18-23]. The $CCl_4$ biotransformation pathway is depicted in Figure 2. However, smaller amounts of P450 and other CCI4 activation systems are also present in the nuclear membrane [27] and in mitochondria [28]. It is actually believed that the $\bullet CCl_3$ are more prone to suffer addition reactions with cellular components while the $CCl_3O_2\bullet$ tend to preferentially get involved in H abstraction reactions with them [18-23]. Lipids, proteins, DNA, RNA and heme were shown to participate in both addition and H abstraction reactions with both $CCl_4$ derived free radicals [18-23]. Additional secondary deleterious actions might arise as a consequence of those primary interactions (some examples of these altered biomolecules are shown in Figs. 3, 4 and 5). The most intensively studied of them is lipid peroxidation, an oxidative derangement of PUFA lipids producing lipid peroxydes

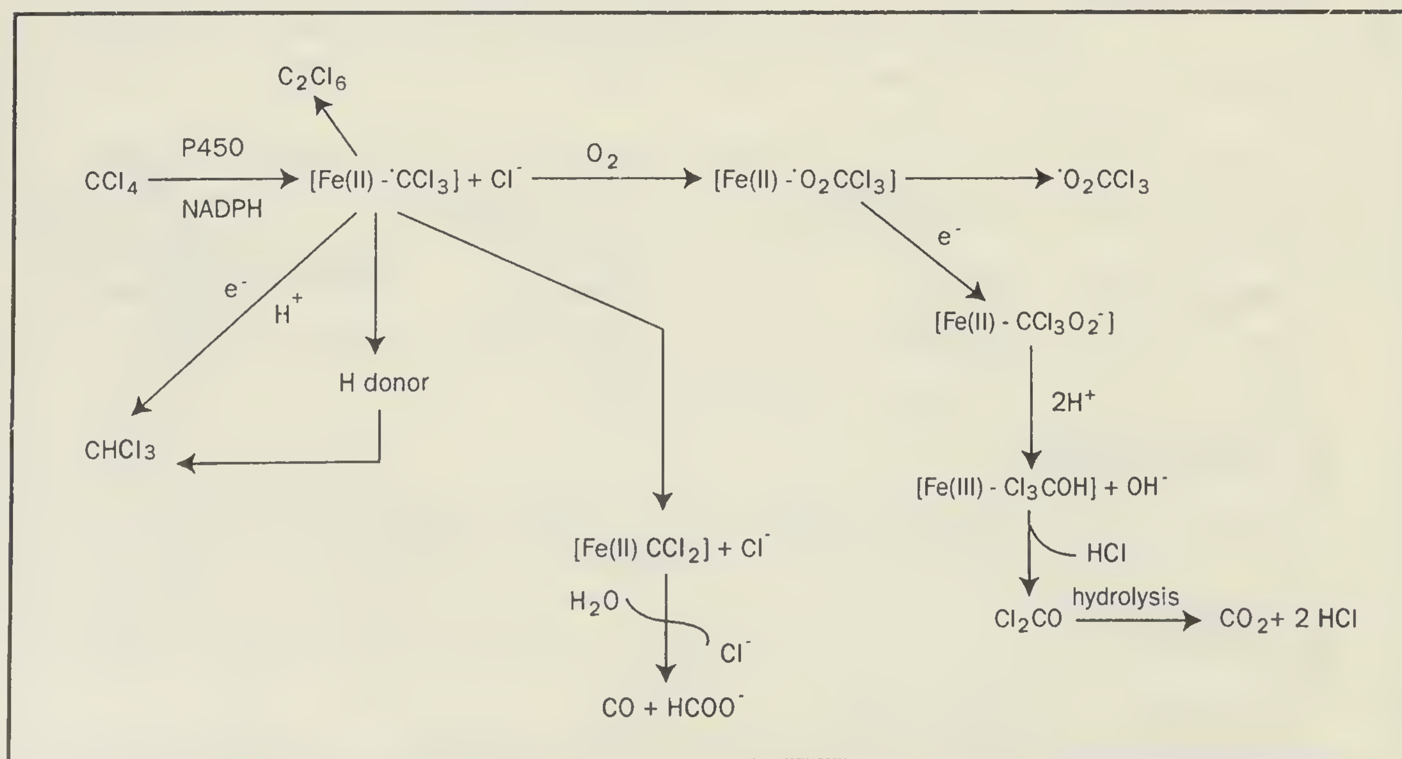
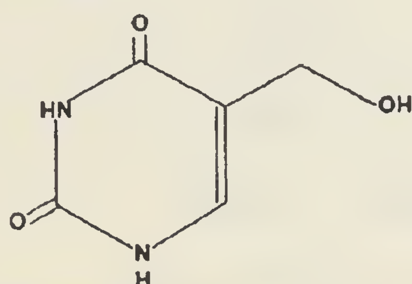
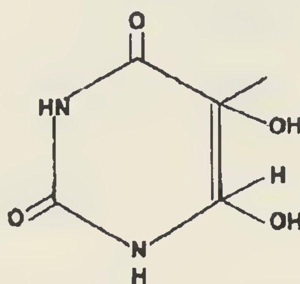


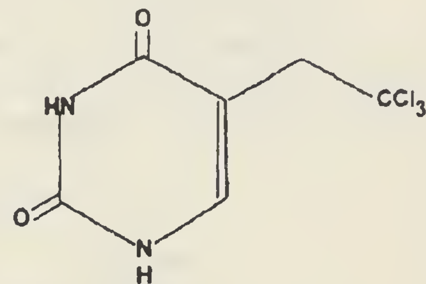

**Figura 2:** Metabolic pathways for $CCl_4$ biotransformation.

or hydroperoxydes and their respective radicals, but also reactive degradation products such as malondialdehyde, 4-hydroxynonenal and others (see Figure 6) [4, 13, 23]. However, as result of DNA (or protein or heme) attack, at least equivalent relevant alterations may also occur which

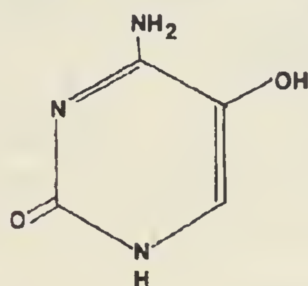
**Thymine**

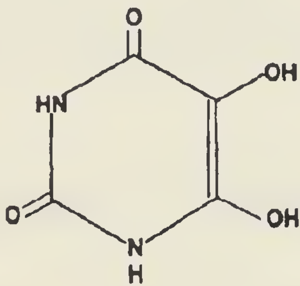


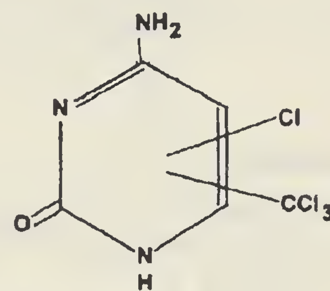




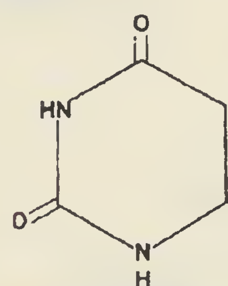

**Cytosine**

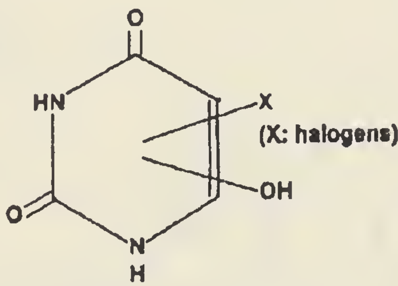


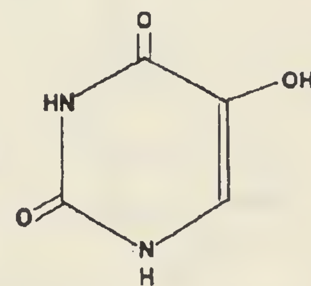




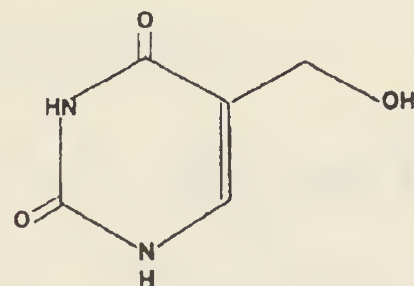

**Uracil**

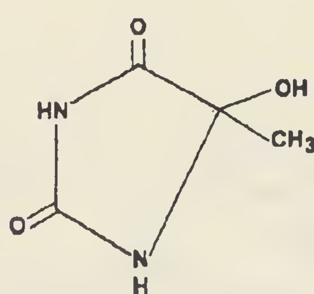


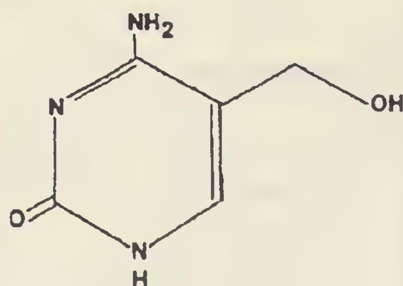





**5-Methylcytosine**








**Guanine**

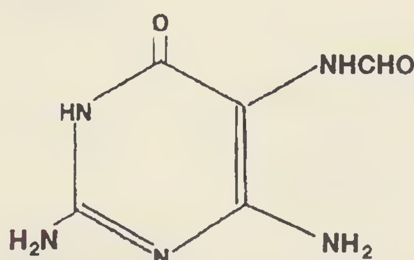
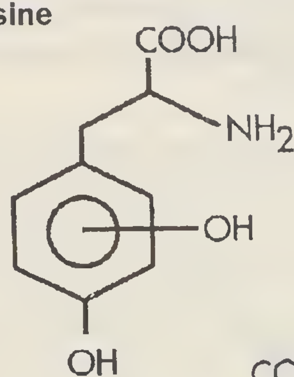
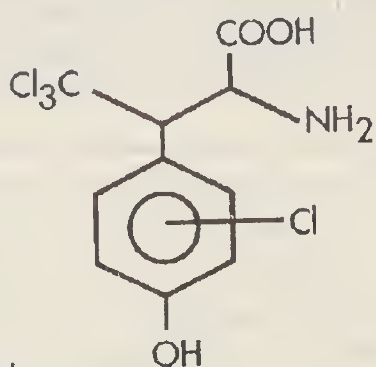
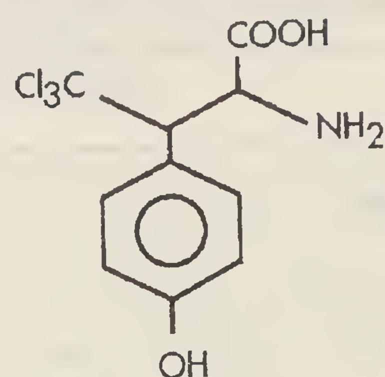


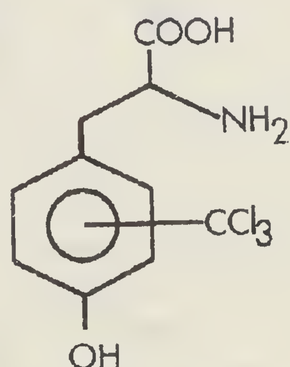

**Figura 3:** Structures of some nucleic acids bases products arising from interaction with $CCl_4$ derived free radicals.

**Tyrosine**

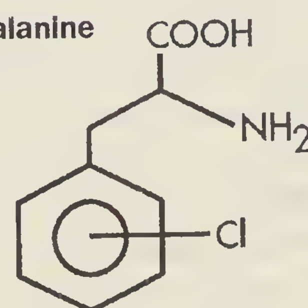


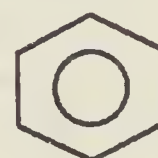




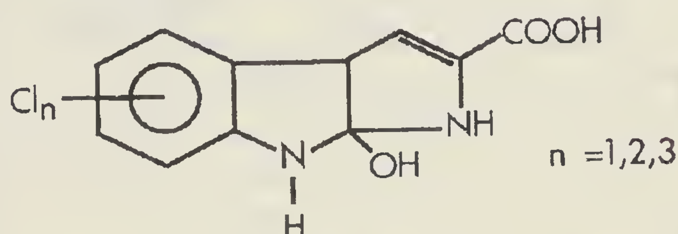



**Phenylalanine**

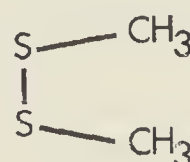


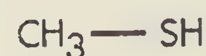


**Tryptophan**

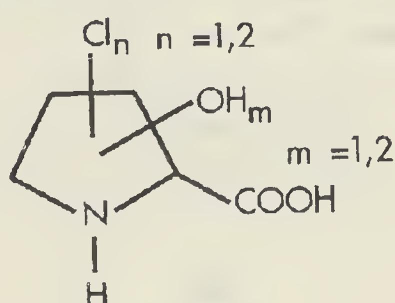


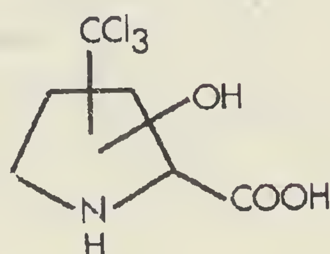

**Methionine**

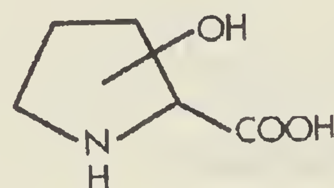




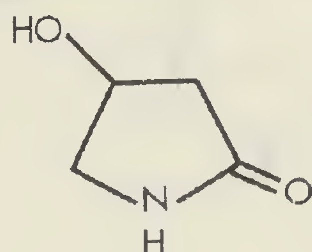

**Proline**

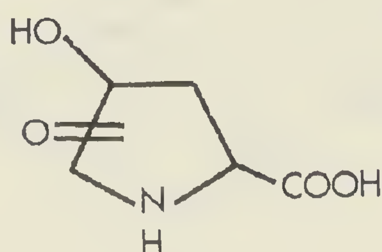


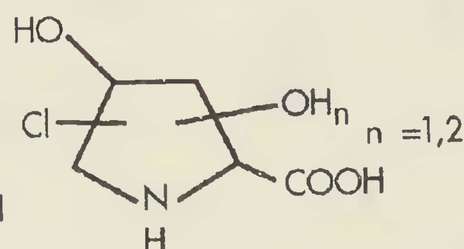





**Hydroxyproline**







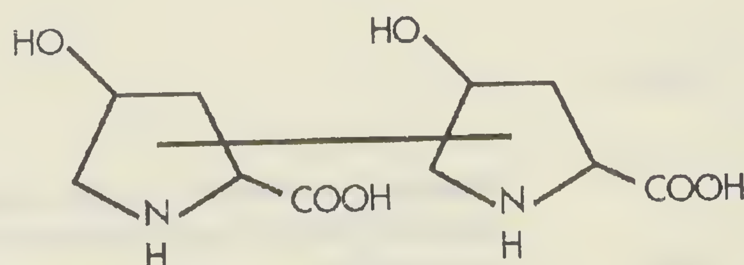



**Figura 4:** Structures of some altered amino acids produced by attack of $CCl_4$ derived free radicals.

have been less studied [23]. For example, oxidative damage to microsomal $Ca^{2+}$ pump at the level of their protein SH groups [30] would harm the liver microsomal $Ca^{2+}$ uptake mechanism [29;30]. Similarly, mitochondrial $Ca^{2+}$ releases mechanisms were also shown to be altered and increased at late stages of poisoning [31], presumably as result of mitochondrial $CCl_4$ metabolism [28; 32]. As consequence of both, damage to microsomal $Ca^{2+}$ uptake and increased mitochondrial $Ca^{2+}$ release by $CCl_4$, hepatocyte $Ca^{2+}$ homeostatic mechanisms result harmed and the cytosolic calcium increases [33-38] (see Fig. 7 for a scheme of normal $Ca^{2+}$ homeostatic mechanisms).

It is presently believed that as a consequence of $Ca^{2+}$ increases in the cytoplasm, protein, phospholipid and nucleic acid degradative processes are sparked, which might be responsible for the liver cell death and the subsequent necrosis [21; 23]. In the Figure 8 is depicted the presently believed mechanism of $CCl_4$ necrogenic effects on the liver.

## DEVELOPMENT OF TREATMENTS AGAINST FREE RADICAL CELL INJURY BASED ON THE KNOWLEDGE OF THE MECHANISM OF ACTION

During the past twenty eight years we were developing treatments operating at almost every single step in the known process by which the hepatocyte exposed to $CCl_4$ finally dies and suffers necrosis. For example, after we learnt that $CCl_4$ transformation to $\bullet CCl_3$ was a P450 depen-

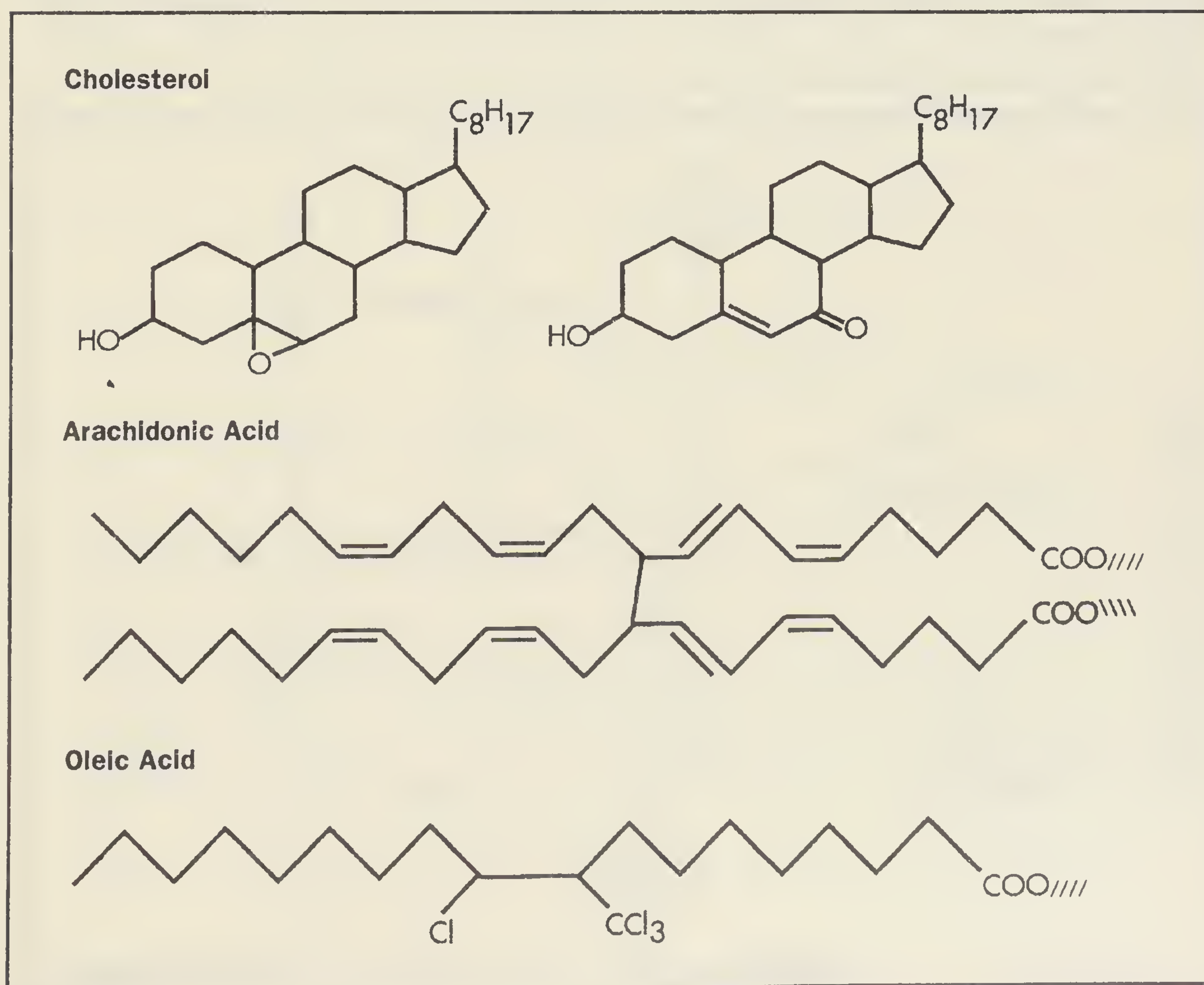



**Figura 5:** Structures of some lipid altered molecules produced by interaction with $CCl_4$ derived free radicals.

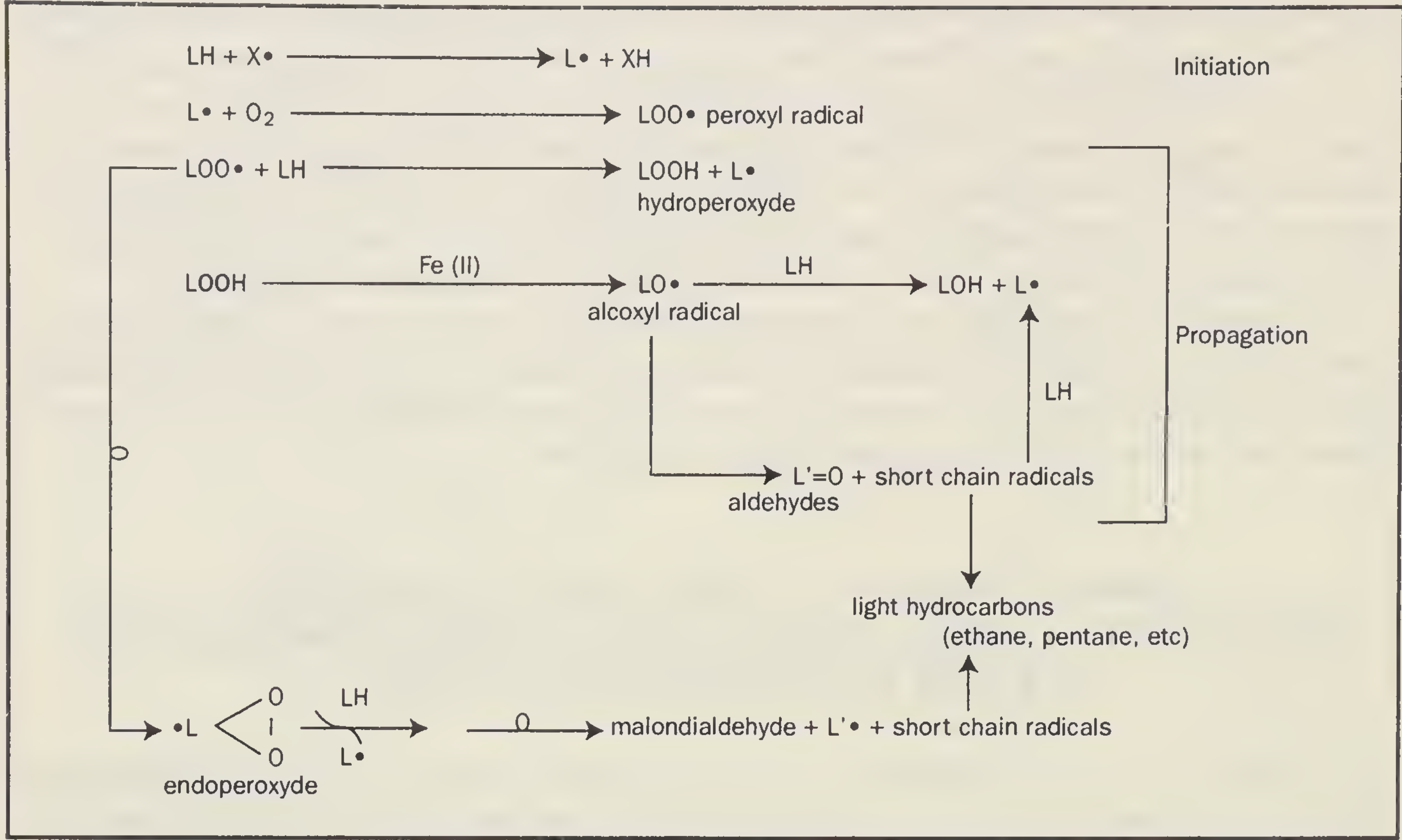



**Figura 6:** Lipid peroxidation process. Reactions involved. X• represents a reactive free radical able to initiate the process by abstraction of a hydrogen atom from a fatty acid chain (•$CCl_3$ $CCl_3O_2$•, OH•).

ER
ER - $Ca^{2+}$ pump
MITOCHONDRIA
UPTAKE
Mit - $Ca^{2+}$ pump
Cyt - $Ca^{2+}$
PM - $Ca^{2+}$ pump
EXT - $Ca^{2+}$
RELEASE
Nu - $Ca^{2+}$ pump
NUCLEI
INTRACELLULAR
EXTRACELLULAR

**Figura 7:** Intracellular $Ca^{2+}$ homeostatic mechanisms.

dent reductive activation process, we verified that pyrazole and cystamine, which are inhibitors of that biotransformation [26; 39; 40], were also able to prevent $CCl_4$ induced liver necrosis and other ultrastructural and biochemical alterations provoked by the hepatotoxin [26;39;40]. Antioxidants such as α-tocopherol or diphenyl-p-phenylenediamine, which are potent inhibitors of lipid peroxidation also partially prevent $CCl_4$ induced liver necrosis [41].

Even after $\bullet CCl_3$ and/or $CCl_3O_2\bullet$ formation or lipid peroxidation there are possibilities for manipulating the final liver necrogenic outcome resulting from $CCl_4$ action. For example, to prevent the deleterious effect of cytosolic $Ca^{2+}$ accumulation lipid soluble $Ca^{2+}$ chelators can be employed to chelate the metal and reduce its actual concentration [42-44]. The requirement for some lipid solubility is critical for otherwise, extracellular chelation of $Ca^{2+}$ might result in tethany before preventive effects on the liver damage may show up [42-44]. We have had success with this approach using alizarine sodium sulfate [42], Calcion [3] and Arsenazo III [44]. Additional preventive possibilities derive from the fact that many effects of calcium require participation of the hormone Camodulin (CaM) [45-48]. For example, using very effective CaM inhibitors we also observed prevention of $CCl_4$ induced liver necrosis [45-48]. There were also preventive effects observable when $Ca^{2+}$ channel blockers were given to $CCl_4$ poisoned animals [49;50]. Further, nicotinamide which presumably should prevent the increased release of $Ca^{2+}$ from mitochondria observed during $CCl_4$ poisoning [51], is also a late preventive agent against $CCl_4$ induced liver necrosis [51]. Inhibition or favourable modulation of degradative processes of phospholipid or proteins by inhibitors of phospholipase $A_2$ such as quinacrine or chlorpromazine [52; 53] or phenylmethylsulfonylfluoride or tosylchloromethylketone [54-56] also resulted to be efficient as late preventive agents.

There are other additonal possibilities for free radicals to induce cell injury. They would derive from the fact that as result of H abstraction reactions mediated by the $\bullet CCl_3$ but fundamentally by the $CCl_3O_2\bullet$ free radicals in target molecules arise (lipids, proteins, nucleic acids,

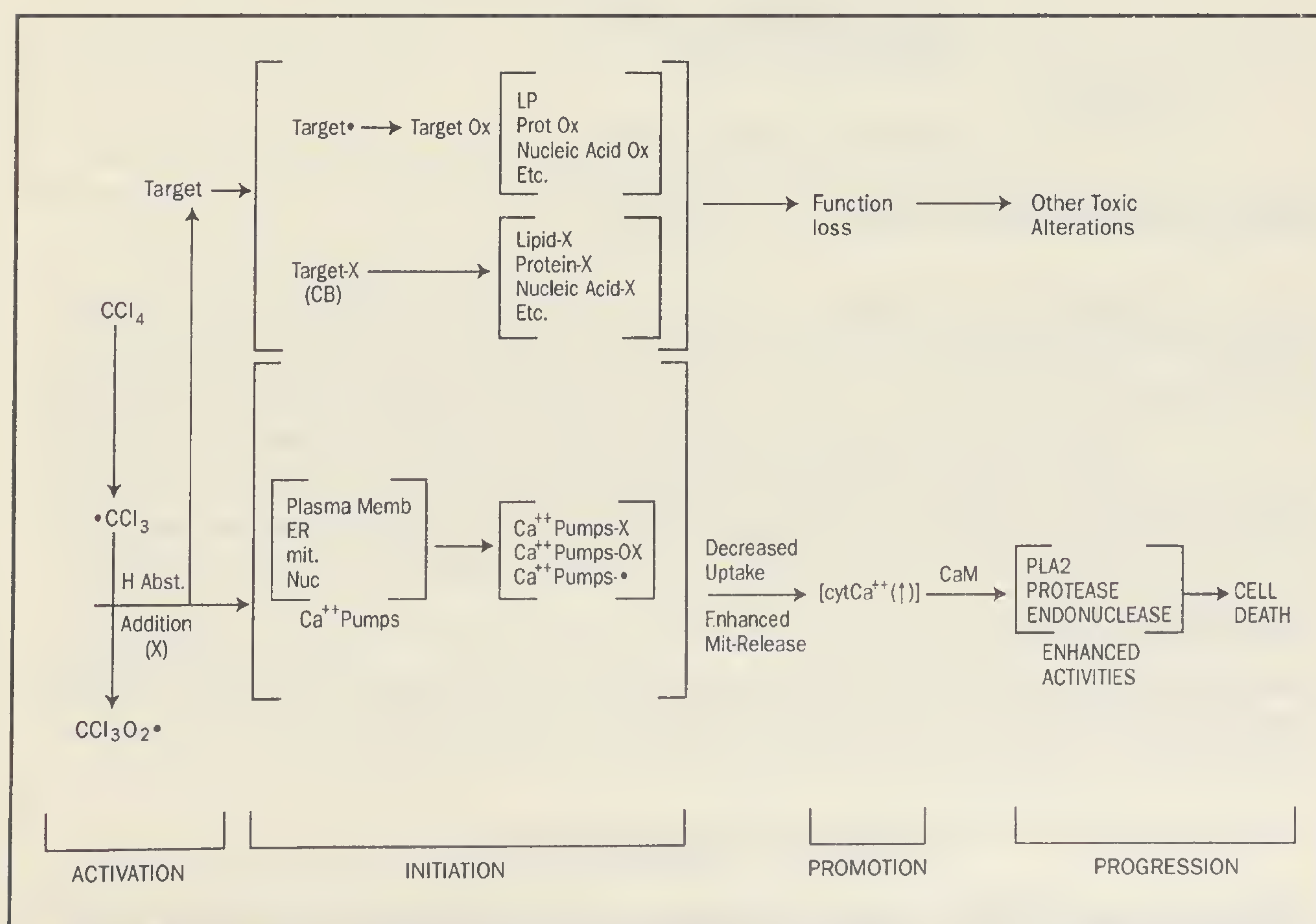



**Figura 8:** Working hypothesis for $CCl_4$ induced liver necrosis.

**1 HOUR**

- Endoplasmic Reticulum: RER / SER - (ER)
  Dilatation / Detachment of ribosomes from RER
  polysime breakdown / dissociation of ribosomes in subunits

**3 HOURS**

- Nuclei: Dilatation pf perinuclear membrane
- ER: Enhacement of effects
- Golgi Apparatus: Dilatation

**6 HOURS**

- Nuclei
- ER
- Golgi

(Nuclei, ER, Golgi) → Enhacement of effects

- Lysosomes: Appearance of autophagic vacuoles, increases in number around biliary canaliculus

**10 - 12 HOURS**

- Nuclei / ER / Golgi: Enhacement of effects
- Mitochondria: Dilatation / Rupture of cristae
- Nuclei: Chromatin condensation

**AFTER 10 - 12 HOURS**

- Nuclear alterations: Total condensation (Pycnosis)
- Chromatin rupture - Dispersion (Karyolysis)
- Plasma membrane: Rupture
- Beginning of necrosis

**24 HOURS**

- Maximum necrogenic effect

**Table 1:** Sequence of events during $CCl_4$ liver poisoning.

heme, etc.). Apparently some of these free radicals have sufficient half life and relevance to injury. This is suggested by the fact that several radioprotective agents which are very efficient H atom donors to free radicals [57-59] are also late protective agents against $CCl_4$ induced necrosis [39; 40; 60-66]. In fact, they were by far more efficient that all the other treatments we deviced, and based just in the calcium accumulation/degradative hypothesis only. That may mean either that not only a unique mechanism of injury is involved or more likely, that the one based on repair of hydrogen abstraction induced damage via H donation includes the other too. That however remains to be proved.

Additionally, something important must also be established and is: whether these treatments, originally designed for the case of the model system $CCl_4$ versus hepatocyte are also valid when extrapolations are made to other free radical mediated toxicities in either liver or other organs.

## ACKNOWLEDGEMENT

To our dear Dr. Cattáneo. An acknowledgement from two generations of chemists who had him as Professor, friend and as a good example to imitiate.

## REFERENCES


1. Castro, J. A. *Toxicología básica. Mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones.* Acta Bioq. Clin. Latinoam. 27, 197-206, 1993.
2. Trump, B.; McDowel, E. M. and Arstila, A. U. *Cellular reaction to injury.* In: Hill, R. B.; La Via, M. F. (eds.) Principles of Pathobiology, Oxford University Press, New York, pp 20-111, 1980.
3. Castro, G. D. and Castro, J. A. *Formación de especies químicas reactivas en la biotransformación de xenobióticos y toxicología.* Acta Bioq. Clin. Latinoam. 22, 221-238, 1988.
4. Castro, G. D. and Castro, J. A. *Reacciones de abstracción de hidrógeno de los radicales libres, peroxidación de lípidos y toxicología.* Acta Bioq. Clin. Latinoam. 24,127-146,1990.
5. Mason, R. P. and Chignell, C. F. *Free radicals in pharmacology and toxicology.* Selected topics. Pharmacol. Rev. 33,189-211, 1982.
6. Fanelli, S. L.; Castro, G. D. and Castro, J. A. *Cholesterol interaction with free radicals produced from carbon tetrachloride or bromotrichloromethane by either catalytic decompositon or via liver microsomal activation.* Chem. Biol. Interact., 98, 223-236, 1995.
7. Castro, G. D. and Castro, J. A. *Cytosine attack by free radicals arising from bromotrichloromethane in the presence of benzoyl peroxide.* Terat. Carcinog . Mutat. 1 3, 235-245, 1993.
8. Castro, G. D.; Simpson, J. T. and Castro, J. A. *Interaction of trichloromethyl free radicals with thymine in a model system. A mass spectrometric study.* Chem. Biol. Interact. 90, 13-22, 1994.
9. Castro, C D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A. *DNA bases attack by reactive metabolites produced during carbon tetrachloride biotransformation and promotion of liver microsomal lipid peroxidation.* Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 95, 253-258, 1997.
10. Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A. *Reaction of bromotrichloromethane derived free radicals with uracil in a model system. Structures of products formed.* Free Rad. Res. 23, 431-442, 1995.
11. Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A. *5-methylcytosine attack by free radicals arising from bromotrichloromethane in a model system: Structures of reaction products.* Free Rad. Biol. Med., 17, 419-428, 1994.
12. Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A. *Tyrosine attack by free radicals derived from catalytic decomposition of carbon tetrachloride.* Free Rad. Biol. Med.16, 693-701, 1994.
13. Castro, G. D.; Díaz Gómez, M. I. and Castro, J. A. *Interaction of trichloromethyl free radicals with phenylalanine.* Arch. Toxicol. 65, 340-343,1991.
14. Castro, G. D.; Stamato, C. J. and Castro, J. A. *Proline interaction with trichloromethyl and trichloromethylperoxyl free radicals in a model system. Studies about the nature of the reaction products formed.* Drug Met. Rev. 27, 257-275,1994.
15. Castro, G. D. and Castro, J. A. *Tryptophan reaction with free radicals arisen from carbon tetrachloride in a model system. A mass spectrometric study.* Redox Report, in press, 1995.
16. Castro, G. D. and Castro, J. A. *Hydroxyproline reaction with free radicals generated during benzoyl peroxide catalytic decompositon of carbon tetrachloride. Structure of reaction products formed.* Amino Acids 10, 283-294, 1996.
17. Smuckler, E. A. *Structure and function on the endoplasmic reticulum in animal cells.* Oslo, Universitetsforlaget, 1968.
18. Slater, T. F. *Activation of carbon tetrachloride; Chemical principles and biological significance.* In: McBrien, D.C.H. and Slater, T.F. (eds.) Free radicals, lipid peroxidation and cancer. Academic Press, New York, pp. 234-274, 1982.
19. Recknagel, R. O.; Glende, E. A.; Dolak, J. A. and Waller, R. L. *Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity.* Pharmacol. Ther. 43, 139-154, 1989.
20. Castro, J. A. *Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury.* Proc. 9th. IUPHAR Intl. Congress Pharmacol. 2, 243-250, 1984.

21. CASTRO, J. A. *Prevention of chemically induced liver injury.* In: Goldstein, R. S.; Hewitt, W. and Hook, J. B. (eds.) Toxic interactions between chemicals. Mechanisms and effects. Academic Press, New York, pp. 233-257, 1990.
22. RECKNAGEL, R. O. AND GLENDE, E. A. *The carbon tetrachloride hepatotoxicity model: free radicals and calcium homeostasis, in "Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine"* (J. Miguel; A. T. Quintanilla and H. Weber, eds). CRC Press, Boca Raton, FL, vol. III, pp 3-16, 1989.
23. CASTRO, J. A. AND CASTRO, G. D. *Carbon tetrachloride.* In: Sipes, I. G.; McQueen C. A. and Gandolfi, A.J. (eds.), Comprehensive Toxicology, Vol. 9, McCuskey, R. and Earnest, D. L. (eds.), Elsevier Science, NewYork, pp. 251-271, 1997.
24. RHODIN, J. A. *A text and atlas.* Oxford University Press, New York, pp 580-594, 1974.
25. ARIAS, I. M.; PIPPER, H.; SCHACHTER, D. AND SHAFRITZ, D. A. *The liver. Biology and Pathology.* Raven Press, New York, (1982).
26. BEMACCHI, A. S.; CASTRO, C. R. DE; TORANZO, E.G.D. DE; MARZI, A.; FERREYRA E. C. DE; FENOS, O. M. AND CASTRO, J. A. *Pyrazole prevention of $CCl_4$ induced ultrastructural changes in rat liver.* Brit. J. Exper. Pathol., 61, 505-511, 1980.
27. DÍAZ GÓMEZ, M. I. AND CASTRO, J. A. *Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform.* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 27, 191-194, 1980.
28. CASTRO, C. R. DE; BERNACCHI, A. S.; VILLARRUEL, M. C.; FERNÁNDEZ, G. AND CASTRO, J. A. *Carbon tetra-chloride activation by highly purified liver mitochondrial preparations.* Agents and Actions, 15, 664- 667, 1984.
29. Moore, L.; Davenport, G. R. and Landon, E. J. *Calcium uptake of a rat liver microsomal subcellular fraction in response to in vivo administration of carbon tetrachloride.* J. Biol. Chem. 251, 1197-1201, 1976.
30. SRIBASTAVA, S. P.; CHEN, N. Q. AND HOLTZMAN, J. L. *The in vitro NADPH dependent inhibition by $CCl_4$ of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic of hepatic microsomes from male rats.* J. Biol. Chem. 265, 8392-8399, 1990.
31. ALBANO, E.; BELLOMO, G.; CARIVÍ, R.; BIASI, F.; POLI, G. AND DIANZANI, M. U. *Mechanisms responsible for carbon tetrachloride-induced perturbation of mitochondrial calcium homeostasis.* FEBS Lett. 192, 184-188, 1985.
32. TOMASI, A.; ALBANO, S.; BANNI, S.; BOTTI, F.; CORONGIU, F.; DESSI, M. A.; IANNONE, A.; VANNINI, V. AND DIANZANI, M. U. *Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria.* Biochem. J. 240, 313-317, 1987.
33. BRATTIN, W. J. AND WALLER, R. L. *Effect of halomethanes on intracellular calcium distribution in hepatocytes.* Life Sci. 35, 1231-1240, 1984.
34. KRONER, H. *The intracellular distribution of liver cell calcium in normal rats and one hour after administration of carbon tetrachloride.* Biochem. Pharmacol.23, 2907-2915, 1974.
35. DOLAK, J. A.; WALLER, R. L.; GLENDE, E. A. AND NAGEL, R. O. *Liver cell calcium homeostasis in carbon tetrachloride liver cell injury: New data with Fura 2.* J. Biochem. Toxicol. 3, 329-342, 1988.
36. AUDRABI, K.; KAUL, N.; GANGOLY, N. K. AND DILAWARI, J. B. *Altered calcium homeostasis in carbon tetrachloride-exposed rat hepatocytes.* Biochem. Internat. 18, 1287-1295, 1989.
37. PAROLA, M.; ALBANO, E.; AUTELLI, R.; BARRERA, G.; BIOCCA, M. E.; PARADISI, L. AND DIANZANI, M. U. *Inhibition of the high affinity $Ca^{++}$- ATPase activity in rat liver plasma membranes following carbon tetrachloride intoxication.* Chem. Biol. Interact. 73,103-119, 1990.
38. ALBANO, E.; CARINI, R.; PAROLA, M.; BELLOMO, G.; GORIA-GATTI, L.; POLI, G. AND DIANZANI, M. U. *Effects of carbon tetrachloride on calcium homeostasis. A critical reconsideration.* Biochem. Pharmacol. 38, 2719-2725, 1989.
39 CASTRO, J. A.; FERREYRA, E. C. DE; CASTRO, C. R. DE AND FENOS, O. M. DE. *Prevention by cystamine of liver necrosis and early biochemical alterations induced by carbon tetrachloride.* Biochem. Pharmacol. 21, 49-57, 1972.
40. FERREYRA, E. C. DE; FENOS, O. M. DE; BERNACCHI, A. S.; CASTRO, C. R. DE AND CASTRO, J. A. *The-*

*rapeutic effectiveness of cystamine and cysteine to reduce liver cell necrosis induced by several hepatotoxins.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, 221-228, 1978.

41. Castro, J. A.; Sasame, H. A.; H. Sussman and J. R. Gillette. *Diverse effects of SKF525A and antioxidants on carbon tetrachloride-induced changes in liver microsomal P450 content and ethylmorphine metabolism.* Life Sci.,17, 1759-1768, 1968.
42. Ferreyra, E. C. de; Villarruel, M. C.; Bernacchi, A. S.; Fernández, G.; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Prevention of tetrachloride induced liver necrosis by the chelator Alizarin sodium sulfonate.* Exptl. Mol. Pathol. 56, 197-207, 1992.
43. Ferreyra, E. C. de; Villarruel, M. C.; Bernacchi, A. S.; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Late preventive effects against carbon tetrachloride induced liver necrosis by the calcium chelating agent Calcion.* Arch. Toxicol. 63, 450-455, 1989.
44. Ferreyra, E. C. de; Bernacchi, A. S.; Villarruel , M. C.; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Prevention of $CCl_4$- induced liver necrosis by the calcium chelator Arsenazo III.* Exptl. Mol. Pathol. 58, 194-204, 1993.
45. Villarruel, M. C.; Fernández, G.; Ferreyra, E. C. de; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Modulation of the course of $CCl_4$ induced liver injury by the anticalmodulin drug Thioridazine.* Toxicol. Lett. 51, 13-21, 1990.
46. Bernacchi, A. S.; Fernández, G.; Villarruel, M. C.; Ferreyra, E. C. de; Castro, C. R. de; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Further studies on the late preventive effects of the anticalmodulin trifluoperazine on carbon tetrachloride induced liver necrosis.* Exptl. Mol. Pathol. 45, 286-300, 1988.
47. Villarruel, M. C., Fernández, G.; Ferreyra, E. C. de; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Late preventive effects of trifluoperazine on carbon tetrachloride-induced hepatic necrosis.* Toxicol. Appl. Pharmacol., 83, 287-293, 1986.
48. Ferreyra, E. C. de; Bernacchi, A. S.; San Martín, M. F.; Castro, G. D. and Castro, J. A. *Late protective effects of the anticalmodulin drug fluphenazine on carbon tetrachloride-induced livernecrosis.* Biomed. Environ. Sci. 8, 218-225, 1995.
49. Landon, E. J.; Naukan, R. J. and Rama Sastry, B. V. *Effect of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver or rats treated with hepatotoxic agents. Biochem.* Pharmacol. 35, 697-705, 1986.
50. Landon, E. J.; Jaiswal, R. K.; Naukam, R. J. and Rama Sastry, B. V. *Effects of calcium channel blocking agents on membrane microviscosity and calcium in the liver of the carbon tetrachloride treated rat.* Biochem. Pharmacol. 33, 3553-3560, 1984.
51. Ferreyra, E. C. de; Bernacchi, A.S.; San Martín, M. F.; Castro, G. D. and Castro, J. A. *Nicotinamide late protective effects against carbon tetrachloride-induced liver necrosis.* Exptl. Mol. Pathol. 60, 214-223, 1994.
52. Marzi, A.; Toranzo, E. G. D. de and Castro, J. A. *Mechanism of chlorpromazine prevention of carbon tetrachloride induced liver necrosis.* Toxicol. Appl. Pharmacol. 52, 82-88, 1980.
53. González Padrón, A.; Toranzo, E. G. D. de and Castro, J. A. *Late preventive effects of Quinacrine on carbon tetrachloride-induced liver necrosis.* Arch. Toxicol. 67, 386-391, 1993.
54. Ferreyra, E. C. de; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Late preventive effects of phenylmethylsulfonylfluoride on carbon tetrachloride-induced liver necrosis.* Toxicol. Lett., 21, 173-178, 1984.
55. Ferreyra, E. C. de; Villarruel, M. C; Fernández, G.; Fenos, O. M. de; Bernacchi, A. S., Castro, C. R. de and Castro, J. A. *Further studies on the mechanism of the late protective effects of phenylmethylsulfonylfluoride on carbon tetrachloride-induced liver necrosis.* Exptl. Mol. Pathol., 50, 253-269, 1989.
56. Ferreyra, E. C. de; Fenos, O. M. de and Castro, J. A. *Late preventive effects on carbon tetrachloride induced necrosis of the inhibitor of proteases 1-chloro-3 tosyl-amido-7-amino-2-heptanone (TLCK).* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 46, 289-292, 1984.

57. GIAMBARRESI, L. AND JACOBS, A. S. *RADIOPROTECTANS*. IN: CONKLIN, J. J. AND WALKER, R. I. (eds.) Military Radiobiology. Academic Press, New York, pp. 265 301, 1987.
58. FOYE, W. O. *Radioprotective drugs*. In: Wiley, J. & Sons (eds.) Burgers' Medicinal Chemistry, Part lil. New York, pp. 11-43, 1981.
59. KLAYMAN, D. L. AND COPELAND, E. S. *Radioprotective agents*. In: Wiley, J. & Sons (eds.) Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 19, pp. 801-832, 1982.
60. MECCA, M. M. DE; CASTRO, G. D. AND CASTRO, J. A. *Antioxidative stress therapy with dithiothreitol tetraacetate. I. Protection against carbon tetrachloride induced liver necrosis*. Arch. Toxicol. 67, 547-551, 1993.
61. VALLES, E. G.; CASTRO, C. R. DE AND CASTRO, J. A. *N-Acetyl cysteine is an early but also a late preventive agent against carbon tetrachloride-induced liver necrosis*. Toxicol. Lett. 71, 87-95, 1993.
62. VALLES, E. G.; CASTRO, C. R. DE AND CASTRO, J. A. *Late protective effects against CCl4-induced liver necrosis by the radioprotective agent 2-aminoethyl isothiouronium bromide hydrobromide (AET)*. Toxicology 90, 71-80,1994.
63. GORLA, N.; FERREYRA, E. C. DE; VILLARRUEL, M. C.; FENOS, O. M. DE AND CASTRO, J. A. *Studies on the mechanism of glutathione prevention of carbon tetrachloride induced liver injury*. Brit. J. Exptl. Pathol. 64, 388-395, 1983.
64. FERREYRA, E. C. DE; FENOS, O. M. DE; BERNACCHI, A. S.; CASTRO, C. R. DE AND CASTRO, J. A. *Treatment of $CCl_4$- induced liver necrosis with cheminsl compounds*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 42, 513-521, 1977.
65. FERREYRA, E. C. DE; FENOS, O. M. DE AND CASTRO, J. A. *Studies on the protective effect of diethyl dithiocarbamate against liver cell injury elicited by carbon tetrachloride*. Anales Asoc. Quím. Arg. 70, 731-742, 1982.
66. FERREYRA, E. C. DE; CASTRO, J. A.; DÍAZ GÓMEZ, M. I.; D'ACOSTA, N.; CASTRO, C. R. DE AND FENOS, O. M. de. *Prevention and treatment of carbon tetrachloride hepatotoxicity by cysteine*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, 558-568, 1984.

ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA, VOLUMEN 227 - NÚMERO ESPECIAL, 1997 (55 - 70)

# LA EVOLUCION DE UNA PARTE DEL PENSAMIENTO BIOLOGICO MODERNO Y LA REVOLUCION SILENCIOSA DE LA ENDOCRINOLOGIA BASICA DE FINES DEL MILENIO

*Carlos P. Lantos*

Laboratorio de Esteroides, Dpto. de Química Biológica,
Facultad de Ciencias Exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires y PRHOM–CONICET,
Ciudad Universitaria, Pab. II. (1428) Buenos Aires, Argentina

## RESUMEN

Los orígenes de las ciencias relacionadas con la transmisión de información en los vertebrados se ubican en escasos decenios de la segunda mitad del siglo pasado, asociándose con los nombres de Mendel, Darwin y Bernard. Términos tales como ***medio interno, secreciones internas y homeostasis,*** que se generaron en aquella época o más tarde, evolucionaron luego, cambiando a veces de significado. El trabajo describe el sentido que les dieron fisiólogos desde Claude Bernard hasta nuestros días y sostiene que la tendencia del conocimiento endócrino básico será evolutiva–adaptativa. Describe cómo cambios graduales en la estructura de moléculas hormonales pueden llevar a cambios de sus roles biológicos, de una manera análoga a lo que Darwin describió para modificaciones morfológicas, por ejemplo las modificaciones de los miembros superiores de los mamíferos. Enuncia como "revolución silenciosa de la endocrinología básica", la toma de conciencia de las estrategias adaptativas convergentes por las que moléculas únicas pueden producir idénticos efectos hormonales a través de mecanismos heterogéneos, estrategias que sitúa entre las maneras que posee el organismo de generar y utilizar vías alternativas de supervivencia y reproducción. Finaliza hipotetizando sobre las consecuencias de esta revolución poco citada, no sólo en los campos básico y epistemológico, sino también en la propuesta de mecanismos de acción alternativos y criterios experimentales que de ella derivan.

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

## ABSTRACT

The origins of information-sciences in vertebrates may be traced back to the second half of the 19th. century and may be associated to the names of Mendel, Darwin and Bernard. Terms such as ***milieu intérieur, internal secretions and homeostasis,*** generated at that time or later, evolved and sometimes changed their meaning in later periods. This paper describes different interpretations given since by physiologists to these terms and postulates evolutionary and adaptive trends for future studies in basic endocrinology. Thus gradual changes introduced into hormonal molecules may lead to alterations of their biological roles in a sequence recalling that described by Darwin for the adaptive results of morphological changes in the upper limbs of mammals. The work defines the "silent revolution in basic endocrinology" as the awareness of converging adaptive strategies by which single molecules may produce identical hormonal effects through multiple mechanisms. These ideas may lead to new basic and epistemolgical viewpoints generating new ideas on alternative hormonal mechanisms and experimental criteria.


## ORIGENES

Las leyes de la herencia de Gregorio Mendel, los principios de la evolución de Lamarck y Darwin y la introducción de las técnicas experimentales al estudio de la fisiología, debida principalmente a Claude Bernard constituyen tres de los cuatro pilares del pensamiento biológico moderno. De estos fundamentos, y los creados por Pasteur, surgen las líneas que marcan la evolución del aún limitadísimo conocimiento que tenemos de los seres vivos.

Curioso comienzo, el de la biología moderna: Darwin (1809-1882), Mendel (1822-1884) y Bernard (1813-1878) fueron contemporáneos y nadie puede dudar de la coherencia de y entre sus investigaciones y teorías, coherencia que sería difícil de encontrar aún en la actual era informática, en la que las bases de datos ofrecen información a velocidad electrónica. Hoy se pensaría que algún investigador "despierto", habiéndose informado de las leyes de la herencia y mediante sus propias observaciones, infirió –y logró demostrar experimentalmente– la supervivencia de los herederos de aquellos genes que mejor permitieran su adaptación al medio, y que algún otro, basándose en bibliografía existente, esbozó los mecanismos mediadores para esta adaptación.

Muy poco de esto ocurrió en realidad. Hubo cierta comunicación entre Mendel y Darwin, pero éste, con admirable intuición hasta hoy inexplicable, escribió su *Origen de las Especies* antes de que Mendel relatara sus primeros resultados de cruzamientos de guisantes; antes, por consiguiente, de que difundiera sus leyes de la herencia. Con Claude Bernard la paradoja fue aún más drástica: no nos consta que haya existido comunicación alguna entre éste y Mendel o Darwin, aunque fuera tan sólo a nivel de charlas informales. Es más, no se mencionan en sus escritos y no me extrañaría que no hayan tenido noticias de su mutua existencia. Sin embargo, a la par de (su también contemporáneo) Pasteur, los tres revolucionaron el pensamiento biológico en un período cortísimo, coincidente con la segunda mitad del siglo XIX, de una manera tan profunda y –repito– coherente, que es imposible imaginar cualquier adelanto biológico moderno, incluyendo los propios de la ingeniería genética y demás ramas de la biotecnología, que no se origine en el conjunto coordinado de sus trabajos y observaciones.

De los cuatro es sin duda Bernard el que más contribuyó al nacimiento de la ciencia que se ocupa de la transmisión intracorporal de la información, aunque debemos reconocer que es siempre arriesgado hablar de un solo origen, de un "fundador" único de determinada disciplina. A pesar de esto, los experimentos y razonamientos que continuamente se "redescubren" en

la obra de Bernard no pueden sino considerarse como introductorios a las que hoy conocemos como disciplinas de "regulación por señales" (signalling).

Una de las características de su obra fue la *gradualidad*, fruto de la cautela del experimentador, con que Bernard elaboró sus conceptos. El de *medio interno* surgió de sus estudios sobre la sangre y la independencia de las propiedades de ésta del medio ambiente. Quemando etapas, hoy lo definiríamos como "aquello que se regula". La constancia de la temperatura sanguínea fue lo que le llamó la atención, así como el hecho (cualitativo por entonces), de que la sangre contuviese un cierto monosacárido, la glucosa, independientemente de su provisión desde el medio externo. Poco a poco Bernard extendió el concepto de *milieu intérieur* al conjunto de líquidos constantes del organismo, plasma, linfa y líquido intersticial, –conjunto al que llamó también *matriz fluida*– e introdujo al idioma francés un neologismo: *la fixité du milieu intérieur.* Siguió su conocida frase: *la fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre*, y esta




**Figura 1:** Claude Bernard, enseñando prácticas de fisiología animal, según un grabado de L'hermitte de 1889, refotografiado por Franz Halberg. La figura aparece en los capítulos de D. C. Tosteson: The significance of Claude Bernard's Philosophy of Science for Modern Medical Research and Education, y del mismo Halberg: Claude Bernard and the "Extreme Variablity of the Internal Milieu" ambos del libro: Claude Bernard and Experimental Medicine, editado por Francisco Grande y Maurice B. Vischer (Schenkman Publishing Co., Cambridge, Mass 1967). El último capítulo citado es de particular interés para esta crónica.

otra, complementaria, de la estrecha y sabia relación entre los cambios-estímulo y las respuestas del cuerpo.

El otro concepto introducido por Bernard que nos es caro es él de *secreción interna*. Lástima que no es exactamente lo que hoy entendemos por tal: la "secreción interna" del autor fue nada menos que ...el glucógeno sintetizado por el hígado. De todos modos, sus experimentos sobre el polisacárido de reserva le sirvieron para definir, por primera vez, que un órgano podría cumplir simultáneamente dos funciones, una de secreción externa a través de un conducto, y otro de secreción interna volcada directamente a la circulación.

Estos experimentos y conceptos, así como sus primitivos ensayos de neurofisiología, contribuyeron al nacimiento, tanto de la endocrinología como de lo que la neurofisiología moderna aportaría al conocimiento de la transmisión de la información adaptativa (o sea, "cómo se regula").

A poco de la muerte de Bernard, los fisiólogos ingleses Bayliss y Starling introducen el concepto de *hormona* (yo estimulo). Las hormonas, productos de la secreción interna, son moléculas transmisoras de información entre células. Basados en los trabajos de estos, años más tarde, ya en la década de 1920, Walter B. Cannon, George Higginson Professor of Physiology de la escuela médica de Harvard, definirá el término *homeostasis* como una "condición que varía para mantener la constancia". Nótese que "homeostasis" es el concepto que más se acerca a lo que, al final de sus investigaciones graduales, Bernard había elaborado como la "fijeza del medio interno".

Interesante personalidad la de Cannon, quizás junto a Bernardo Houssay y Hans Selye el último de los fisiólogos humanistas. Basado en las clases de Starling a quien veneraba, escribió un libro titulado *The Wisdom of the Body*, en el que nos sorprende con la siguiente licencia poética:

> "... Repetidamente, en capítulos anteriores, llamé la atención sobre el hecho siguiente: si nuestro medio interno se mantiene constante nos libraremos de las limitaciones perturbadoras que nos imponen factores tanto internos como externos. Fue Barcroft quien planteó la pregunta pertinente: ¿libertad de qué? Se trata sobre todo de la libertad activa a niveles superiores del sistema nervioso y de los músculos que éste gobierna. La corteza cerebral mantiene las relaciones inteligentes con el mundo que nos rodea. Ella nos hace analizar nuestra experiencia, desplazarnos de un lugar a otro, construir aeroplanos y templos, pintar obras de arte, llevar adelante investigaciones científicas e inventar, reconocer y conversar con amigos, educar a nuestros jóvenes, expresar nuestra simpatía o declarar nuestro amor, en una palabra, comportarnos como seres humanos. La alternativa a esta "libertad" sería el sometimiento a las pruebas y obstáculos que el frío exterior o el calor interno, o las perturbaciones de otras constantes de nuestra matriz fluida nos impondrían, o –por otra vía– tal atención consciente al almacenaje de materiales o a cambiar la velocidad de los procesos corporales, todo ello para preservar la constancia, que no nos quedaría tiempo para otras actividades... En resumen, encontramos al organismo liberado para sus tareas más complicadas y socialmente más útiles porque vive en una matriz fluida que automáticamente se mantiene en una condición constante. Cada vez que se presentan amenazas de cambio, surgen indicadores que señalan el peligro y agentes correctivos que previenen los disturbios o restauran la normalidad en donde ésta se encuentra alterada...".

## ESTRATEGIAS CONVERGENTES

Además de una meticulosa descripción funcional del sistema nervioso autónomo, Cannon en su obra analiza las relaciones entre el sistema simpático y la glándula suprarrenal. Es este ór-

gano endócrino un corpúsculo par, diminuto –el par pesa menos de tres diezmilésimos de la masa total de un mamífero– que, a diferencia de otras glándulas esteroidogénicas mucho mas pesadas y voluminosas, es vital. Uno/a puede vivir una larga vida sin haber poseído jamás una placenta, sin testículos u ovarios, y sin sustitución alguna. Pero el ser adrenalectomizado requiere para su supervivencia por lo menos de una dieta sustitutiva rica en cloruro de sodio y una vida sin stress físico ni psíquico, conceptos que hoy por hoy no necesitan mayor explicación. Con todo esto su vida es precaria y fugaz si no se lo medica, además, con las hormonas que patológicamente le faltan o que le fueron quitadas con fines experimentales.

La glándula suprarrenal es interesante también desde el punto de vista integrativo de Cannon: en aves y mamíferos consta de dos regionres principales, una médula y una corteza que la rodea. En otros vertebrados las posiciones relativas de ambas pueden variar topográficamente, pero los que no se alteran en toda la escala son su origen, composición química de su secreción interna, función y contigüidad. Es así como el *tejido cortical* y *el medular* se originan tempranamente a partir de hojas diferentes del embrión, naciendo el segundo de la hoja ectodérmica como parte del esbozo del sistema nervioso, mientras que el cortical se origina en el mesoder-

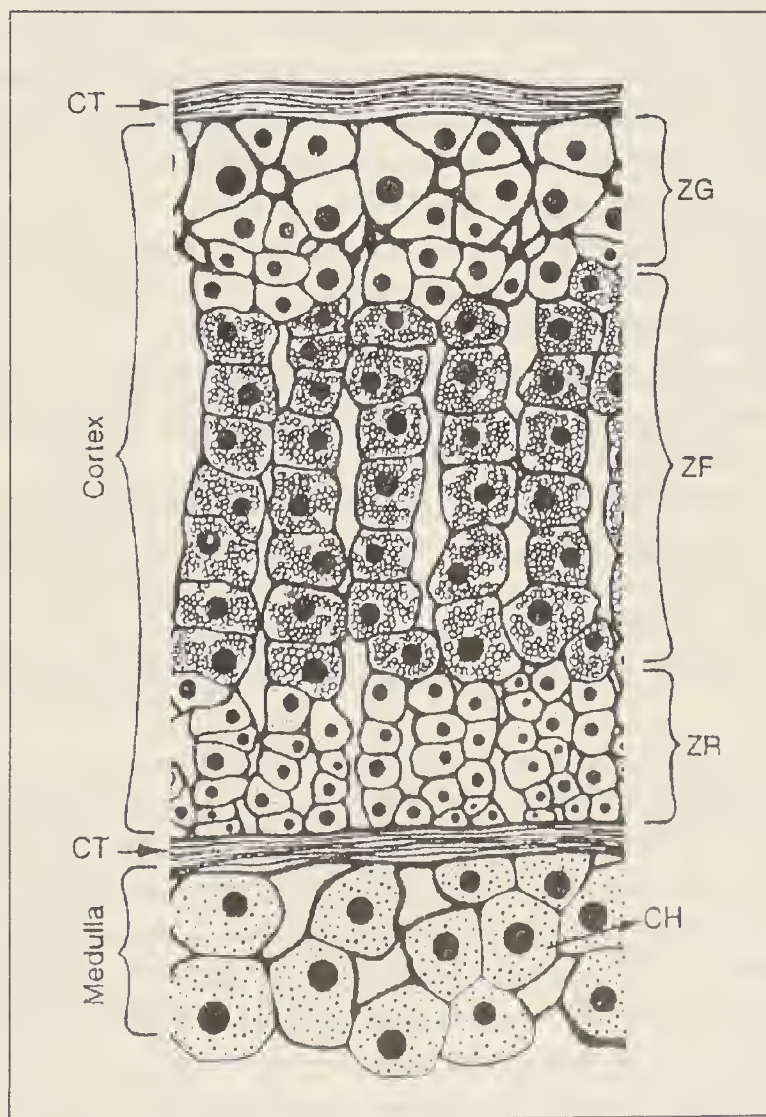



**Figura 2:** Corte transversal de la glándula suprarrenal humana. La zona glomerulosa (ZG) es la única que sintetiza el mineralocorticoide más potente, aldosterona, las zonas fasciculada (ZF) y reticular (ZR) sintetizan y segregan glucocorticoides, y esta última también andrógenos. La médula (Medulla), formada por células cromafines (CH), segrega catecolaminas las que, como los glucocorticoides de su zona cortical contigua, estan involucradas en la respuesta al *stress*. La médula –aquí sólo representada por sus primeras capas– está conectada con la corteza mediante un sistema porta, y las secreciones de ambas se interregulan a nivel metabólico. (Tomado de David Norris, *Vertebrate Endocrinology*, tercera edición, Academic Press, 1997).

mo como típico tejido endócrino. Luego las partes migrarán a lugares contiguos que definitivamente ocuparán en el organismo adulto y que, como vimos, varían de clase dentro de los vertebrados. Tanto la corteza como la médula suprarrenal segregan sustancias –señal de un peso molecular. Las de esta última, como formación nerviosa que es, son neurohormonas, en este caso pertenecientes al grupo de las *catecolaminas*. La médula adrenal sintetiza únicas y característicamente, a partir de otras parecidas, una catecolamina llamada *adrenalina*. El papel de la adrenalina en el stress es bien conocido. La corteza adrenal, en cambio, segrega lípidos denominados *esteroides*. Estos son hormonas propiamente dichas que cumplen con los más diversos papeles, desempeñando las de la corteza suprarrenal principalmente un rol sodiorredentor *(mineralocorticoides)* o de respuesta al stress bajo sus diversas formas, *(glucocorticoides)*. La figura 2 y su leyenda muestran que la zona cortical más contigua a la medular es la que comparte con la médula esta última propiedad.

El papel de la glándula adrenal no se reduce, sin embargo, al control del medio interno ni a la respuesta al stress. Esteroides corticales muy parecidos estructuralmente a los glucocorticoides y a los mineralocorticoides, también sintetizados por la corteza, ejercen funciones progestágenas unas y androgénicas las otras. En la literatura se ha descrito por lo menos un caso en que la corteza adrenal suple la función sexual en ratones ovarectomizados.

Quede como residuo de esta algo árida descripción de anatomías y roles, que la glándula suprarrenal ejerce funciones múltiples a través de hormonas que la involucran profundamente en adaptaciones vitales y no vitales, y que sus secreciones internas son ejemplos de moléculas de diferente origen, algunas de las cuales –segregadas en sitios contiguos– cumplen con papeles semejantes, mientras que otras, químicamente emparentadas como sustrato–metabolito, desempeñan funciones distintas entre sí. Estas características la hacen particularmente interesante a los fines que nos ocuparán más adelante.

Cabe a Cannon el mérito de haber sido el primero en darse cuenta de la importancia que tiene muchas de estas analogías y diferencias –y especialmente la contigüidad de tejidos nervioso y endócrino– para la fisiología del organismo.

Años más tarde se generalizará y desarrollará la neuroendocrinología. En cuanto a la adrenal, se encontrará un papel funcional a un sistema porta que comunica las dos partes y se descubrirá cómo ambas secreciones se interrelacionan funcionalmente a través de su recíproca regulación. La evolución más reciente de los conocimientos endócrino y neuroendócrino, y el conocimiento más amplio de la biología molecular del que forman parte, es de divulgación general.

Por estas características vitales y adaptativas por excelencia, y en aras de una mejor ilación y mayor brevedad, la glándula adrenal y sus funciones nos seguirán sirviendo como modelo de evolución conceptual. En los años 60 y 70 se popularizó un modelo del "mecanismo de acción" de las hormonas esteroideas que para los mineralocorticoides se esquematiza muy linealmente en figura 3 y su leyenda. Para algunos era como si se hubiese cumplido un sueño reduccionista que empezó con Bernard y que termina explicando minuciosa y linealmente los pasos mecanísticos entre un desequilibrio del medio interno *–pérdida de sodio–* y la respuesta homeostática consistente en la *retención* de este catión, todo ello mediado por una de las secreciones de la corteza suprarrenal. Un esquema muy semejante se encontrará para el mecanismo de acción de los estrógenos y andrógenos. La figura 3 y el panel izquierdo de la número 4 son paradigmáticos de estos años, en que se generalizan conceptos tales como *segundos mensajeros*, durante muchos años circunscriptos al adenosinmonofosfato cíclico, y luego *receptores*.

Ya en esa etapa las cosas empezaron a diferir cuando consideramos los glucocorticoides. La misma figura 4 nos muestra –en efecto– que, de un esquema lineal publicado por un conocido neuroendocrinólogo aún activo, pasamos en pocos años a un entrevero muy complejo que, con un poco de imaginación, se parece a un globo con dos polos –stress y glucemia– unidos por una serie de meridianos, a su vez conectados por muchas paralelas, todos ellos representativos de

los múltiples mecanismos interrelacionados que median no sólo entre el mencionado par estímulo-respuesta, sino también entre los mismos procesos mediadores. Mucho más compleja aún es la intrincada red neuroendócrino-inmunológica que relaciona los estímulos corticales con la respuesta inmune del cuerpo a través de impulsos nerviosos, neurotransmisores, citoquinas y hormonas clásicas.

Esto, finalmente, nos lleva a la última parte de la crónica, en la cual uno empieza a preguntarse por qué la naturaleza se empeña en complicar una relación que, si permaneciera lineal, facilitaría tanto el aprendizaje como el entendimiento de la regulación por señales. El fenómeno no se reduce a la función glucoconicoide ni, para el caso, a la endocrinología, sino que se

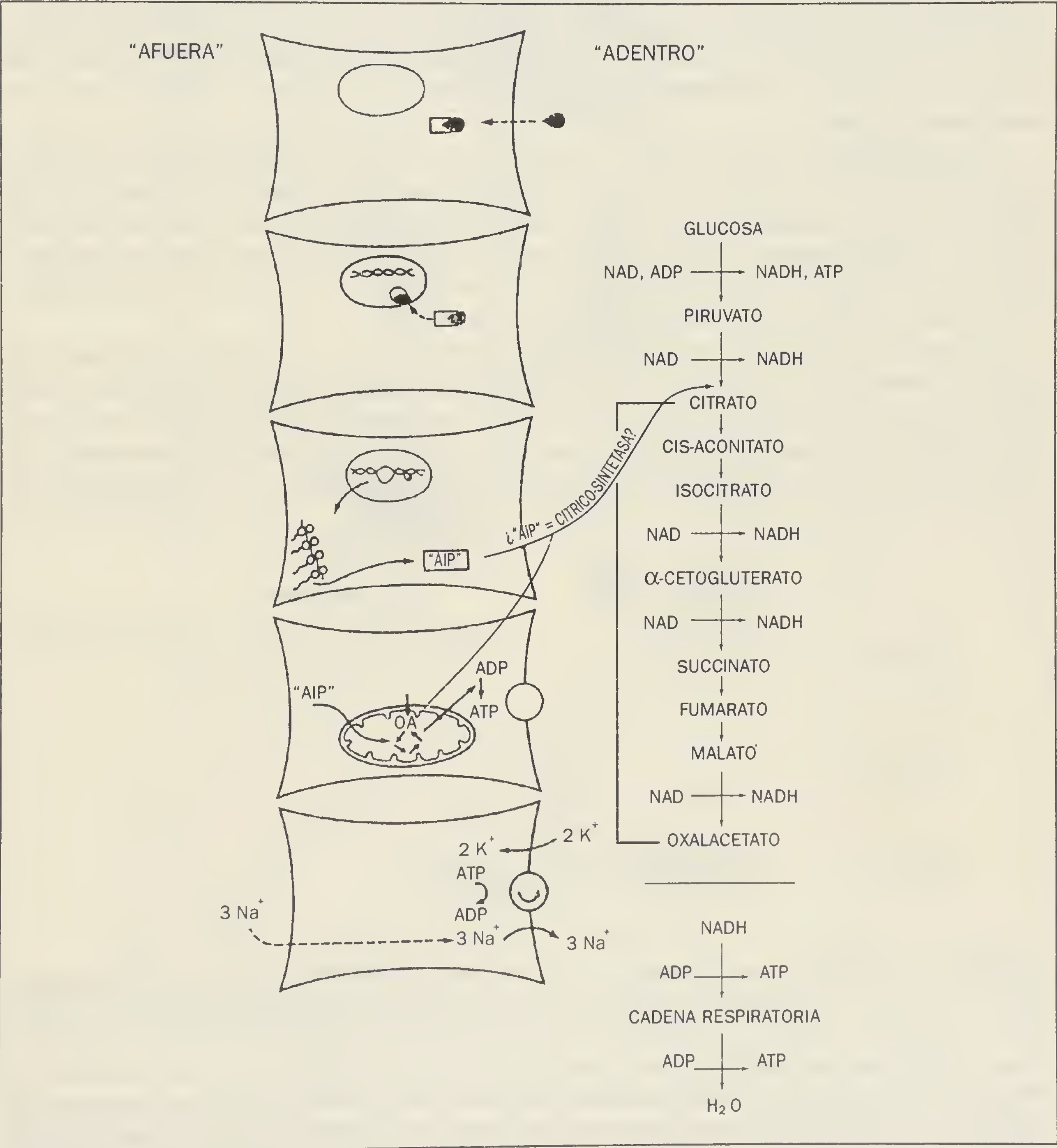



**Figura 3:** Ideas que en 1985 se tenían del mecanismo de acción de la aldosterona, tomado del Capítulo de C.P.L: Endocrinología molecular de la función mineralocorticoidea, en Endocrinología Molecular, editado por R. S. Calandra y A. F. De Nicola, (2da. edición, El Ateneo, Bs. As., 1985). Hoy por hoy el conocimiento de estos mecanismos se ha complicado al extenderse éstos a varios cuadros de la figura y a otros procesos no representados.

reencuentra con una simpleza casi gráfica en las primeras representaciones de las redes neuronales. Quizás la respuesta adecuada tenga que ver con la misión de la naturaleza, que no consiste en facilitar las cosas a los estudiosos, sino, probablemente, a posibilitar supervivencias de individuos y especies, y –¿quién sabe?– a mejorar calidades de vida, a través de adaptaciones. Y una manera de hacerlo es, indudablemente, multiplicar las vías alternas a tales metas, que se suplen o complementan en una especie de estrategia convergente, por si fallaren algunas, o para hacer frente a nuevos tipos de estímulos y desafíos. Darwin, quien en el *Origen de las Especies* distinguió entre "afinidades reales y semejanzas analógicas o adaptativas" lo dijo a su manera: "La semejanza en la forma del cuerpo y en los miembros anteriores, en forma de aleta, entre los cetáceos y los peces es analógica. Podemos comprender claramente por qué los caracteres analógicos o adaptativos, aún cuando sean de importancia capital para el bienestar del ser, carecen casi de valor para el sistemático. Pues animales pertenecientes a dos estirpes muy distintas pueden haberse adaptado a condiciones similares, y con ello haber llegado a una fuerte semejanza externa..."

La posibilidad de lo que en clínica médica se conoce como "compensaciones" de estados patológicos ha de inscribirse en esta clase de adaptaciones darwinianas. La alternativa que posibilita compensar mediante la respiración (pérdida de anhídrido carbónico) una acidosis metabólica y –simétricamente– la eliminación compensatoria de protones por orina en respuesta a apneas es un ejemplo de tales adaptaciones. La meta a alcanzar por una vía u otra, (aunque no excluya otras metas) es siempre la eliminación de protones.

En endocrinología se han encontrado en estos últimos años una asombrosa variedad y cantidad de estrategias convergentes. Ya hemos hablado de algunas que –muy arbitraria y quizás anacrónicamente– podríamos calificar de *anatómo-funcionales* (ver contigüidad e interrelaciones médula-corteza adrenales). Las más curiosas, sin embargo, son aquellas convergencias que se caracterizan por mecanismos diferentes para moléculas-señal únicas. Las llamaremos arbi-

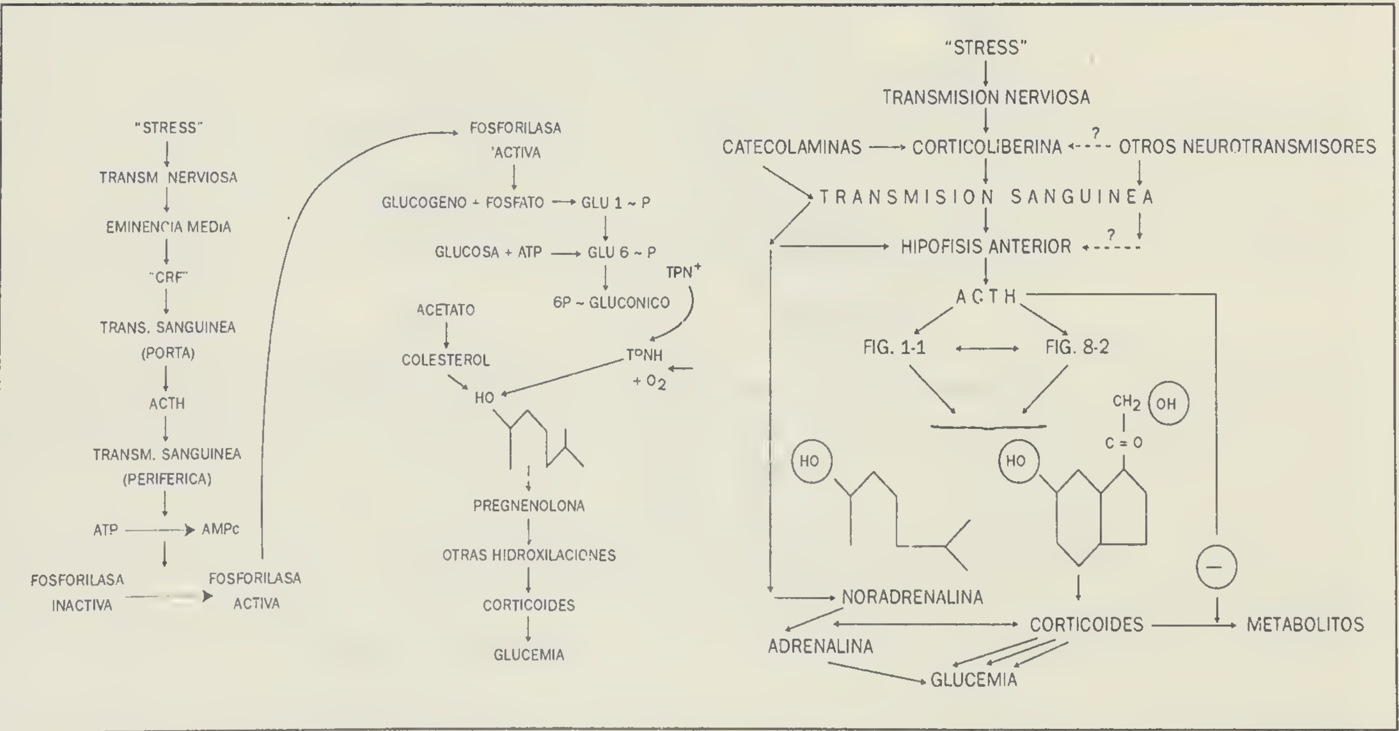



**Figura 4:** Comparación entre los conocimientos acerca de la función glucocorticoidea en 1962 y 1980. El esquema de la izquierda pertenece a una review de Murray Saffran (Brit. Med. Bulletin 18: 122, 1962), el de la derecha, a la Introducción por C.P.L. a la primera edición de Endocrinología Molecular de Calandra y De Nicola (El Ateneo, 1980). Las leyendas Fig 11 y Fig.8-2 del esquema derecho, se refieren a figuras de este libro. Aquí tambien, el "globo terráqueo" se ha complicado aún más desde la publicacion de este esquema a estos días, destacándose ahora el cross-talk entre por lo menos dos mecanismos a través de los cuales la ACTH regula la corticoidogénesis.

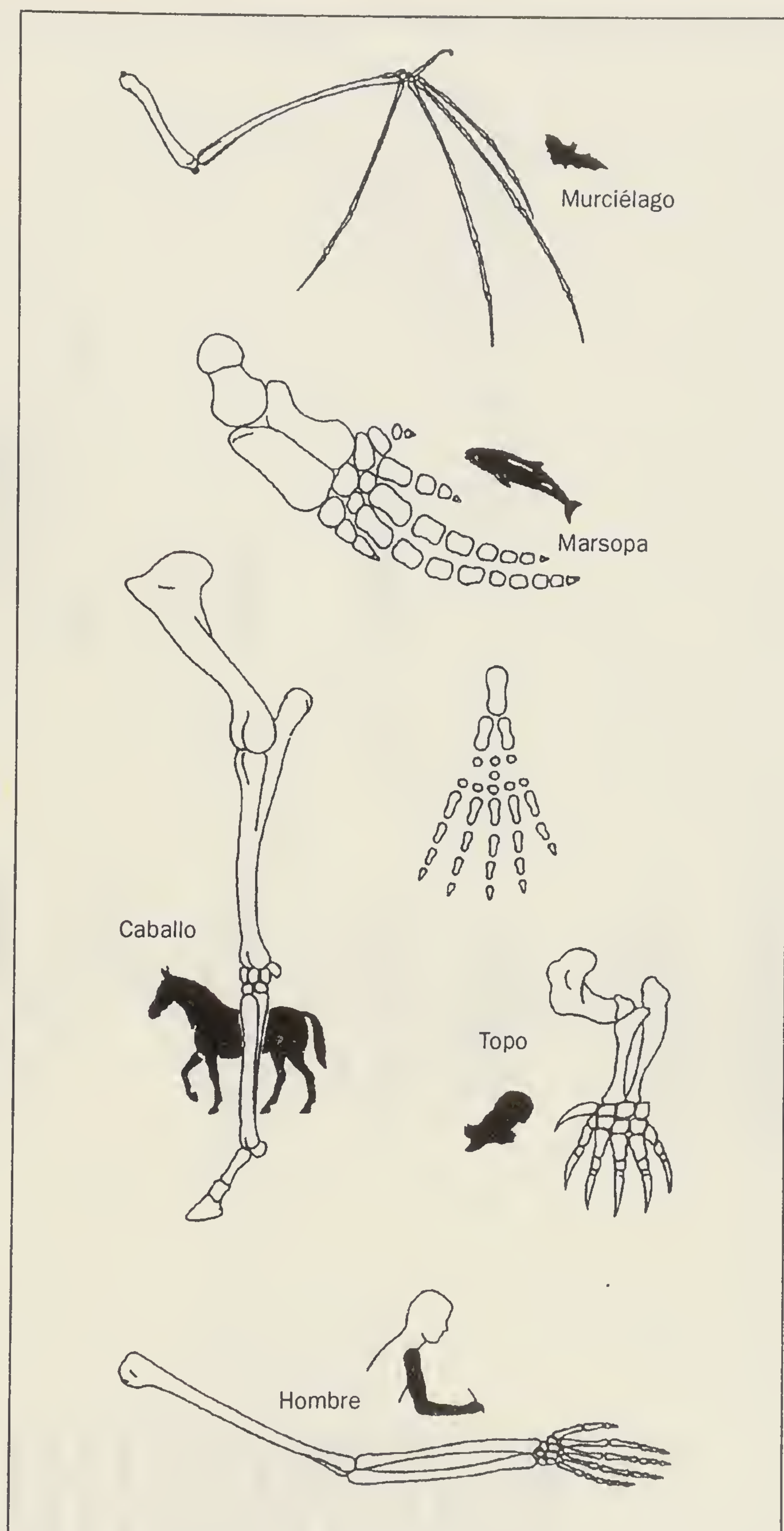



**Figura 5:** Modificaciones morfológicas graduales que se producen, según Darwin, en la adaptación de los miembros superiores de los mamíferos. *¿Qué puede haber más curioso, dice Darwin, que el hecho de que la mano del hombre formada para agarrar, la de un topo para excavar, la pata de un caballo, la aleta de la marsopa y el ala de un murciélago posean huesos similares en las mismas posiciones.* Los autores de esta revisión, Richard Leaky, W. F. Bynnum y J. A. Barrett agregan: *El esquema del centro ilustra el plan básico de los huesos que se encuentran en las extremidades anteriores de todos los mamíferos. Cada uno de estos huesos puede haberse alargado, acortado, adelgazado, e incluso haberse perdido por entero para adaptar al miembro anterior a diversos fines de las especies.* (Charles Darwin: *El Origen de las Especies.* Versión abreviada e introducción de Richard E. Leakey. Edición española de Ediciones Serbal, Barcelona 1983).

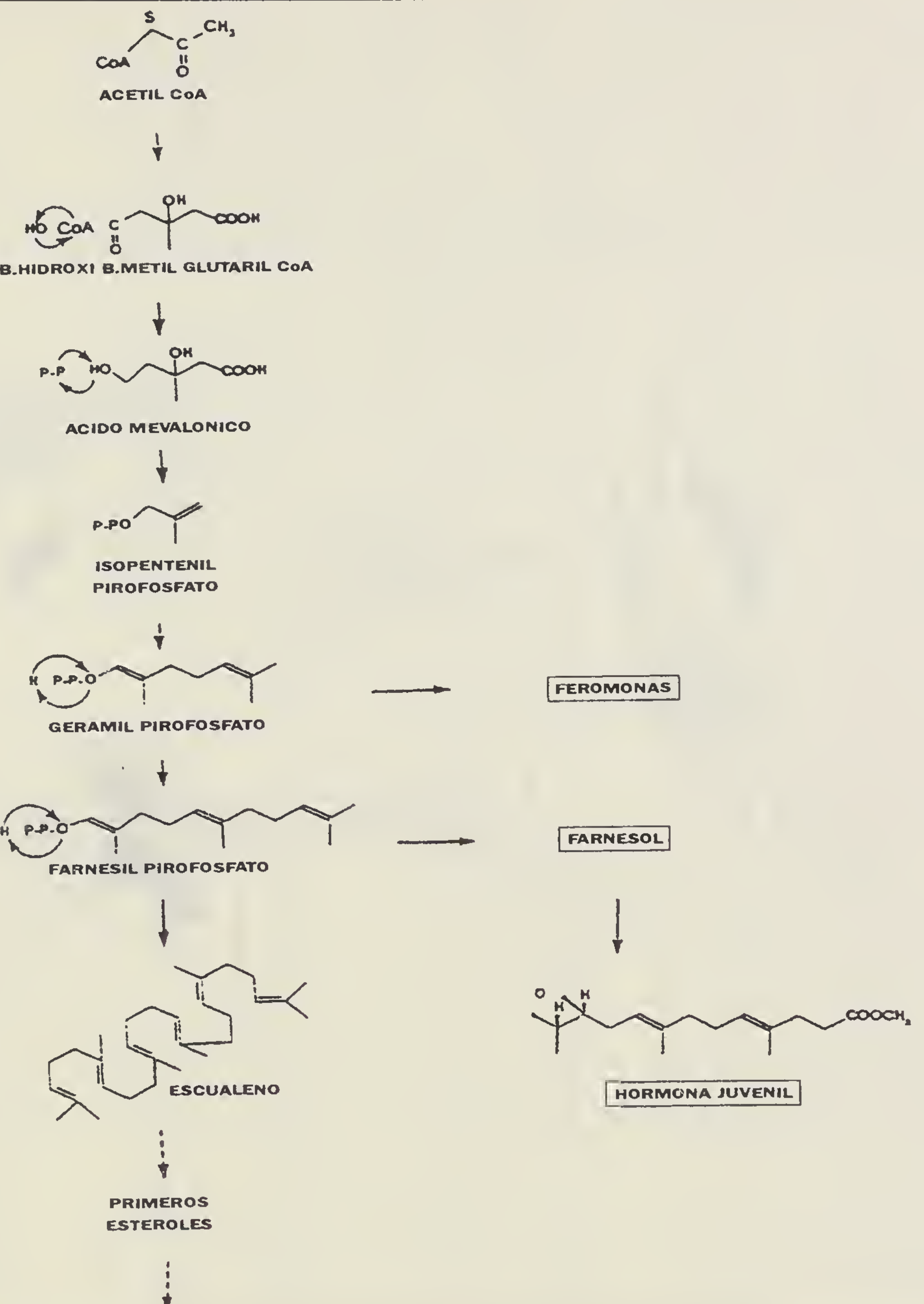
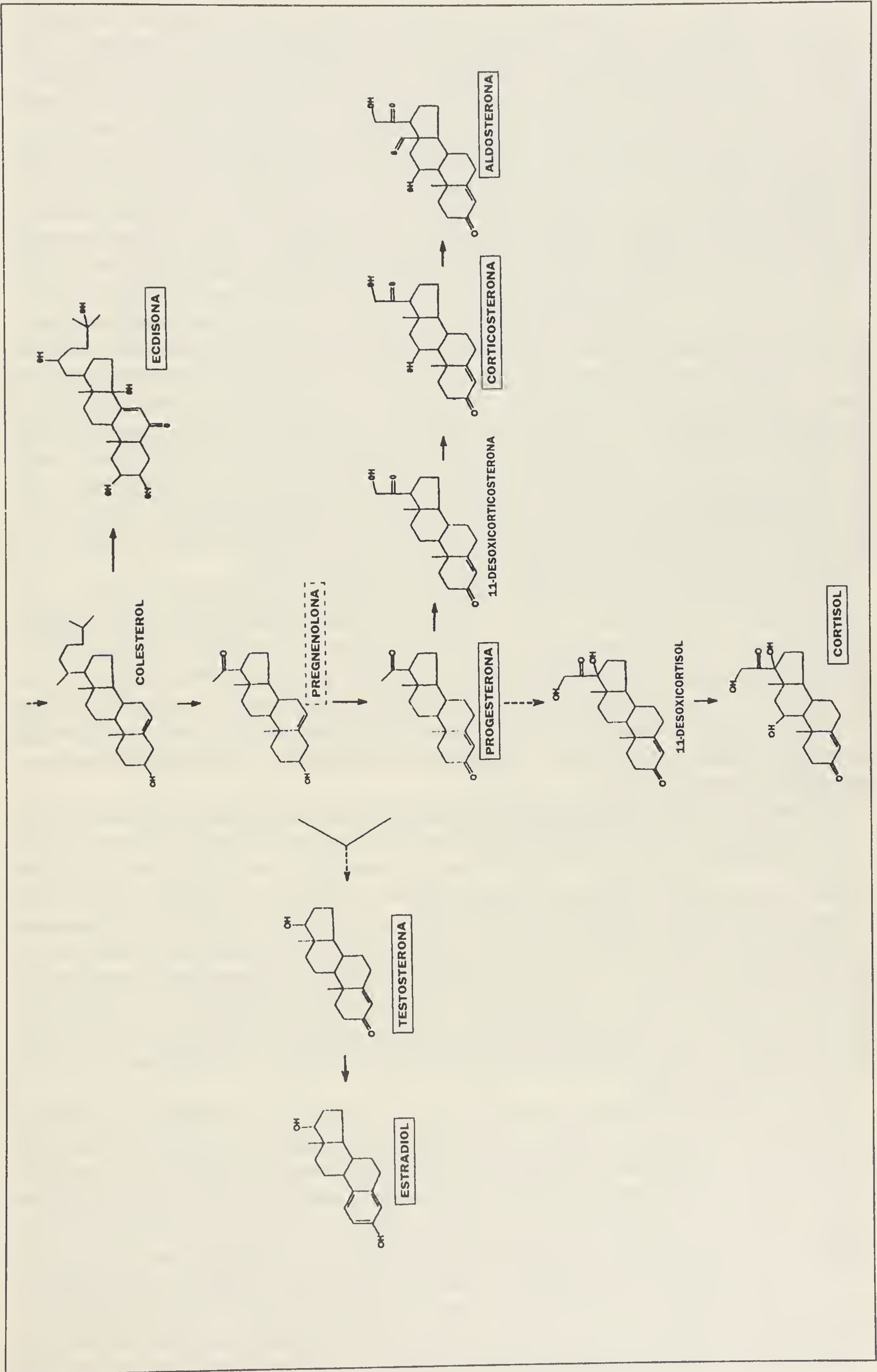



**Figura 6:** Modificaciones moleculares graduales a lo largo del camino biosintético de los terpenoides-esteroides, que se producen en respuesta a requerimientos de conservación del individuo (homoestáticos) o de la especie. Los nombres encerrados en rectángulos llenos corresponden a hormonas de diferentes acciones biológicas, (feromonas, juveniles, de muda en artrópodos; sexuales de diversas funciones, sodiorretentoras glucocorticoideas u otras en vertebrados), algunas de las cuales son precursoras de otras hormonas de función biológica distinta de la de su precursora. A la pregnenolona, considerada hasta hace poco como precursora pura, se le asigna ahora un papel de neurohormona.


COLESTEROL
ECDISONA
PREGNENOLONA
PROGESTERONA
11-DESOXICORTICOSTERONA
CORTICOSTERONA
ALDOSTERONA
11-DESOXICORTISOL
CORTISOL
TESTOSTERONA
ESTRADIOL

trariamente estrategias convergentes *moleculares*. Se encuentran tales estrategias para moléculas únicas a nivel de: *a)* efectos hormonales *genómicos* coincidentes con *no genómicos*. Casi siempre los primeros, a diferencia de los segundos, requieren un reconocimiento previo por receptores y casi siempre, también, los genómicos requieren intervalos *(lags)* más prolongados para expresarse. *b)* Muy ligada al punto anterior, la movilización a partir de *pools* inactivos, como inicio rápido de una acción hormonal, seguida de otros mecanismos más lentos pero más persistentes. Estos últimos son generalmente genómicos mientras que los primeros comprenden genéricamente una vasta gama de eventos moleculares no-genómicos instantáneos tales como fosforilaciones, cambios conformacionales de proteínas ligados o no a aquéllas, disociaciones de dímeros en monómeros activos, disociaciones de complejos receptor-proteínas "protectoras" y otros. *c)* La inducción o represión, genómicas por antonomasia, de varias enzimas, todas las cuales llevan a resultados coincidentes. *d)* Inducciones a niveles pre y postranscripcional. *e)* "Conversaciones cruzadas" *(cross–talks)* entre *varios* sistemas de señalización de que se vale una misma hormona, o un neurotransmisor, para regular la síntesis de mensajeros intracelulares. *f) Transportes favorecidos,* ya sea de precursores o de sustancias-blanco, ora unidos a proteínas transportadoras, ora a través de membranas tanto celulares como mitocondriales. Si, por ejemplo, tuviésemos que actualizar la figura 3, nos encontraríamos en 1997 con la "novedad" de que la "misma" aldosterona ejerce su efecto sodiorretentor mediante múltiples mecanismos, correspondientes a varios de los niveles (cuadros) representados, y aún a otros no representados. No cabe duda de que la enumeración en este párrafo, que ya ahora podría ser más amplia, crecerá considerablemente en lo poco que queda del milenio.

Llama la atención, en efecto, cómo moléculas individuales relativamente sencillas (esteroides, péptidos cortos, hormonas de la tiroides y otros) pueden adaptarse a una variedad tan grande de mecanismos fisicoquímicos de lo más heterogéneos, pertenecientes inclusive a disciplinas diferentes, para ejercer una idéntica función biológica. En cierta manera, Darwin lo había previsto: "... La selección natural actúa únicamente sacando partido de pequeñas variaciones sucesivas, nunca puede realizar un salto súbito y grande sino que debe avanzar mediante pasos cortos y seguros, aunque lentos... **La naturaleza es pródiga en variedad pero tacaña en innovación**." (negrita nuestra).

Es bastante común, en nuestra etapa del conocimiento biológico, hipotetizar sobre evoluciones moleculares, a semejanza de los dendrogramas morfológicos de Darwin. La figura 6 representa tal posibilidad para el camino biosintético que arranca de la acetil-coenzima A, atraviesa estructuras muy sencillas tales como los isoprenoides, y termina en estructuras cada vez más condensadas, complejas y oxidadas como las hormonas esteroideas. Como en los dendrogramas morfológicos, las moléculas hormonales cambian su rol biológico a medida que sufren gradualmente pequeños cambios (en este caso se oxidan) y se tornan crecientemente especializadas, adaptándose cada vez más a las necesidades contingentes de los individuos y de las especies. Esto se ve notablemente en lo extremos de las ramas y en la cima del árbol, donde estas mismas hormonas, de gran actividad biológica especializada, pierden su "flexibilidad" como precursoras de otras hormonas.

Existen en la litetratura unos pocos ejemplos de otras series de correlaciones: las existentes entre estructuras moleculares "hechas a medida" y efectos hormonales a diversos niveles. Hace poco, Burton y colaboradores sintetizaron más de dos docenas de esteroides estructuralmente parecidos a los corticosteroides naturales, que se diferenciaban entre si por cambios graduales en su geometría: Progresaban estos esteroides sintéticos, y otros naturales que también participaban de la serie, desde una conformación muy plana hasta conformaciones con cierto ángulo de torsión. El objetivo del trabajo fue doble: investigar la posibilidad de correlaciones lineales entre geometrías y capacidad sodiorretentora de ratas adrenalectomizadas -una propiedad "crudamente biológica"-, por un lado, y entre geometría y unión a receptores renales específicos por el otro. Entre los dos intentos de correlación los autores intercalaron otra, en la que

utilizaron directamente el citosol renal –sin pasos purificadores– como fuente de receptores a mineralocorticoides (i.e. sodiorretentores). Los primeros resultados, publicados en Molecular Pharmacology y resumidos en figura 7, muestran que las moléculas más planas son las más activas y que, sorprendentemente, la representación de geometría vs retención de sodio, o sea la más "biológica" de las correlaciones intentadas, ofrece la mejor linealidad. El coeficiente de correlación se deteriora a medida que las representaciones de las abscisas se alejan de la "realidad biológica". De hecho, el más plano de los esteroides sintéticos es al mismo tiempo uno de los mineralocorticoides más activos, pero sólo se une mediocremente a los receptores específicos. Obsérvese también la otra característica darwiniana repetidamente citada en esta crónica: a pesar de la semejanza estructural, algunos esteroides representados poseen propiedades hormonales diferentes de la sodiorretención, tales como las progestágenas.

Para nosotros lo más importante es que –paralelamente a la analogía-molecular-morfológica que sugiere la comparación mencionada de las figuras 5 y 6– surge una segunda característica: la preferencia de los parámetros moleculares-conformacionales por la propiedad "crudamente biológica" (i.e. retención de sodio) antes que por la unión a receptores purificados, y el deterioro de las correlaciones a medida que el factor de las abscisas se aleja del parámetro biológico (sodiorretentor) "puro". Lo lógico sería –siguiendo el esquema reduccionista de la figura 3–, que la geometría molecular, que indudablemente se adapta a sitios complementarios en los receptores, ofreciera su mejor relación con la afinidad por estas proteínas purificadas. ¿Cómo se explica, entonces, que cambios graduales conformacionales puedan generar cambios sutiles en propiedades biológicas sin la intermediación de alteraciones correspondientes en los receptores específicos? ¿Cómo se explica que esteroides muy planos sean buenos mineralocorticoides pero mediocres ligandos de estas proteínas?

Sostienen los autores que *ningún factor único, llámese receptor, enzima, proteína transportadora, catabolismo, o aún una combinación de estos factores, puede considerarse como mediador exclusivo entre una estructura molecular y un efecto biológico.* Mal que nos pese –sostienen también los autores– la única forma de salir de este *conundrum* es pensar en presiones evolutivas: la gradual torsión molecular en nuestros esteroides podría imitar artificialmente torsiones graduales semejantes ocurridos en la evolución de una serie de esteroides naturales, algunos ya extintos mientras que otros cumplirían un rol distinto del de la retención de sodio. La aparición de proteínas y –en general– *factores* condicionaría, a través del tiempo, el rol sodiorretentor de la serie.

Ya unos anos antes, el biólogo molecular australiano John Funder había publicado un artículo en la revista *Science* cuyo título era "Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated". La conclusión implícita en el título era que *una de las tantas enzimas responsables de la desactivación de los glucocorticoides era la responsable,* antes que los receptores a mineralocorticoides, *de la especificidad sodiorretentora de estas hormonas,* puesto que ambos grupos –mineralcorticoides y glucocorticoides– poseían la misma afinidad por aquellos receptores. La especificidad estaba dada por la enzima debido a las diferencias estructurales entre glucocorticoides y mineralocorticoides, diferencias que permitían a la enzima catalizar la transformación de los últimos, pero no la de los mineralocorticoides, en metabolitos inactivos. En realidad, la conclusión de Funder llegó después de un largo proceso de dudas, durante el cual primero se "culpó" a una proteína transportadora de "secuestrar" a los gluco-pero no a los mineralocorticoides, o sea otra variante sobre el mismo tema. Los últimos experimentos del grupo de Funder hablan de "specificity-conferring mechanisms" (en plural) necesarios para la acción selectiva de la aldosterona en la homeostasis del catión sodio. En el trabajo correspondiente, el grupo reconoce la posibilidad de varios mecanismos inactivantes.

No tanto por todos estos experimentos, sino por la fuerza de los hechos, las estrategias confluyentes están destinadas a revolucionar esta parte de la biología. No sería de extrañar que produzcan un impacto epistemológico, ya que al apartarse la investigación de los esquemas linea-

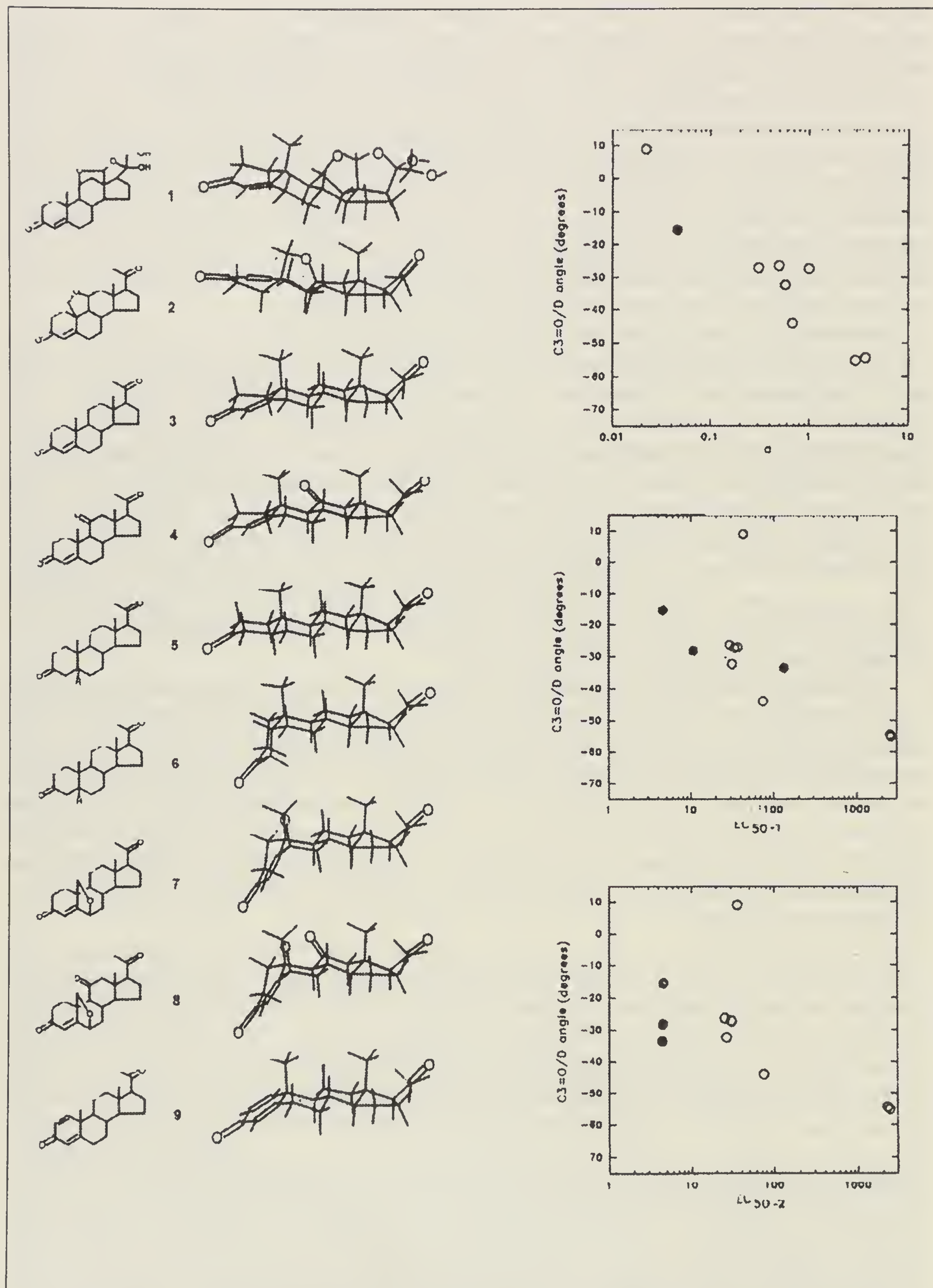



**Figura 7:** ***Izquierda:*** Estructuras planas y conformaciones geométricas de nueve esteroides. ***Derecha:*** Correlaciones de un parámetro molecular geométrico *(ordenadas)* con los siguientes parámetros representados en *abscisas*: (a) acción sodiorretentora, *(EC50-1)* unión a receptores no purificados, *(EC50-2)* unión a receptores purificados. Tomado de: G. Burton, M. Galigniana, T. Brachet-Cota, E. Sproviero, A. Ghini, C. Lantos and M. C. Damasco, *Sodium Retainig Activity of Some Natural and Synthetic 21-Deoxysteroids*. Mol. Pharmacol. 47: 535-543, 1995.

les de los mecanismos de acción, ofrece un campo amplio a los evolucionistas de todas las inspiraciones, desde los discípulos de Dobzhanski hasta los de Teilhard de Chardin, para integrarse con pleno derecho a la endocrinología experimental. Por otra parte, la experimentación endócrina también habrá de sufrir cambios. Ante la multiplicidad de mecanismos intermedios será cada vez menos válido, por ejemplo, apoyarse en parámetros bioquímicos o de biología molecular únicos para "medir" efectos biológico-hormonales. Esto tendrá consecuencias evidentes en farmacología experimental. Más allá de este aspecto puntual, los farmacólogos encontrarán ayuda, ganarán tiempo y evitarán esfuerzos superfluos si deciden inspirarse en la fisiología comparada y la evolución, anteponiéndola en el tiempo al *screening* empírico para el diseño de nuevas drogas. Todo lo cual, casi sin quererlo, generará estudios interdisciplinarios de perfiles hasta ahora desconocidos y contribuirá a borrar los límites grises y artificiales entre "ciencia básica", "ciencia aplicada" y "aplicación biotecnológica" en este campo.

A todas luces, una de las grandes revoluciones de la endocrinología básica se apoya en las sofisticadas técnicas de la biología molecular que permiten recombinar ácidos nucleicos, clonar genes, trabajar con proteínas obtenidas a partir de éstos y estudiar la regulación de la expresión génica por hormonas. Son estas técnicas espectaculares las que permiten el reconocimiento de los Hormone Responsive Elements, la transfección de células con genes reporter conteniendo estos elementos, las técnicas de hibridización *in situ*, así como los diagnósticos de genes alterados en patologías ligadas a cromosomas. Resulta redundante afirmar que estos hallazgos no hubiesen sido ni serían posibles sin haber mediado el postulado de la naturaleza particulada de los genes. Estos ingredientes constituyen –según nuestro esquema– la espectacular "Revolución Mendeliana" moderna. ¿Coexiste ésta con la más silenciosa y más conceptual revolución adaptativa darwiniana?. ¿Empezó la "regulación por señales" con Bernard, siguió con Mendel y termina con Darwin?. Puede ser que la generalización sea exagerada, o por lo menos prematura. Lo que seguramente no cabe en esta secuencia es la palabra "termina".

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Sulli Tessone por las charlas que dieron lugar a estas líneas. También, a todos mis pares del Laboratorio de Esteroides del PRHOM-CONICET, por ideas y críticas, a Andrea Pozzi por su buena disposición y espíritu organizativo en la redacción del manuscrito, a Laura Bruno, las correcciones de estilo, a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por espacio y tiempo.

## LECTURAS PARA PROFUNDIZAR ALGUNOS TEMAS EXPUESTOS

***Históricas:***

- C. Bernard, *Leçons sur les propiétés physiologiques et les altérations pathologiques des liqiuides de l'organisme.* J. B. Balliere Paris, 1859.
- C. Bernard, *Introduction a l'étude de la médecine expérimentale.* J. B. Balliere, 1865.
- Cannon, *The Wisdom of the Body.* W.W. Norton & Co. publishers Inc. New York, 1939.
- Además de los ya listados: *Origen de las Especies de Darwin* y sus biógrafos, que abunda en comentarios sobre éste, Lamarck y Mendel; y *Claude Bernard and Experimental Medicine*, de F. Grande y M. B. Vischer.

***Bibliografía de los últimos cuatro decenios:***


- WURTMAN, R. AND AXELROD J. *Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids.* J. Biol. Chem. 241: 2301-2305, 1966.
- BORRUEL, M., LANTOS C. ET POUMEAU-DELILLE G. *Action in vitro de l'adrénaline sur la synthese des corticoïdes chez le rat et la souris.* C. R. Acad. Sc. Paris 266: 2463-2464, 1968.
- ERHART-BORNSTEIN M., BORNSTEIN S. R, GONZALEZ HERNÁNDEZ J., HOLST J. J., WATERMAN M. R. AND SCHERBAUM W. A., *Sympathoadrenal regulation of adrenocortical steroidogenesis.* Endocr. Research 21: 13-24, 1995.
- FUNDER, J. W., PEARCE P., SMITH R. AND SMITH A. A., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated.* Science 242: 583-585, 1988.
- FUNDER AND K. MYLES. *Exclusion of corticosterone from epithelial mineralocorticoid receptors is insufficient for selectivity of aldosterone action: In vivo binding studies.* Endocrinology 137: 5264-5268, 1996.
- Además de las publicaciones pertinentes listadas en las leyendas a figuras.
- Artículos amenos sobre evolución molecular se pueden encontrar en el libro *Evolution* de la serie de *Libros* del Scientific American (en Español: *Libros de Investigación y Ciencia*), Edición Labor, Barcelona, 1978, así como en el Capítulo 6, por Angel Stoka, de la citada 2da. edición de Endocrinología Molecular.
- Los términos endócrinos y neuroendócrinos están adecuadamente definidos en este libro y en el citado libro de Norris sobre *Endocrinología de Vertebrados.*
- Las fronteras del conocimiento en genética molecular y sus aplicaciones biotecnológicas están descritas en *Biotecnología. El Futuro en Debate,* de la Revista de la Universidad de Buenos Aires, 1 (3), 1995. En lo que atañe a la publicación presente se destacan los trabajos de Víctor Penchaszadeh, J. Lino Barañao y Alberto Kornblihtt.
- Una descripción accesible de la geometría molecular de los esteroides se encuentra en el capítulo 2 de *Endocrinología Molecular* editado por Calandra y De Nicola (2da. Edición).

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (71 - 85)

# ESTABILIDAD QUIMICA DE ALIMENTOS DESHIDRATADOS Y SU RELACION CON LA TRANSICION VITREA

*María del Pilar Buera*

Miembro del CONICET y del Departamento de Química Orgánica, F. C. E. y N-UBA.

*Jorge Chirife*

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428 Buenos Aires, Argentina.

La aceleración de cambios deteriorativos es el resultado de la disminución de viscosidad y consecuente aumento de movilidad cuando un sistema cambia del estado vítreo (a $T < T_g$) al gomoso (a $T > T_g$) (Roos y Karel, 1991).

La aplicabilidad del estudio de la transición vítrea en reacciones de deterioro tuvo su origen en el área de Ciencia de Polímeros y se extendió a otras, como Farmacia, Ciencia de Alimentos y Biotecnología. La razón del aumento de interés para definir el papel de la transición vítrea y movilidad molecular en reacciones químicas es la necesidad de establecer parámetros de control para mejorar la estabilidad de alimentos, drogas y material biológico.

El objetivo de este trabajo fue reunir algunos resultados publicados últimamente por distintos grupos de investigación, con el fin de apreciar el efecto de la transición vítrea sobre la velocidad de reacciones químicas en sistemas modelo de alimentos deshidratados.

## DEPENDENCIA DE LAS REACCIONES DE DETERIORO CON LA TEMPERATURA: ECUACION DE ARRHENIUS VS. ECUACION WLF

Una expresión matemática, conocida como la ecuación de Williams, Landel y Ferry (WLF) (Williams y col., 1955), fue desarrollada empíricamente para describir la dependencia de la vis-

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

cosidad de polímeros sintéticos con la temperatura, en base a datos conocidos de los valores de $T_g$. El modelo no está limitado a viscosidad y puede aplicarse a otros parámetros de relajación o cinéticos (Ferry, 1980). Según esta ecuación, la dependencia de la viscosidad a temperaturas por encima de $T_g$, se puede escribir:

$$\text{Log } (\mu/\mu_g) = -c_1*(T-T_g)/(c_2+(T-T_g)) \qquad (1)$$

Donde:

T: temperatura
$T_g$: temperatura de transición vítrea
$\mu$: viscosidad a la temperatura T
$\mu_g$: viscosidad a la temperatura $T_g$
$c_1$, $c_2$: coeficientes.

Los coeficientes $c_1$ y $c_2$ fueron obtenidos promediando valores obtenidos para muchos polímeros sintéticos, y se les dieron los valores considerados universales que corresponden a -17,44 para $c_1$ y 51,6 para $c_2$ (Williams y col., 1955).

Un punto muy importante en el estudio de las transiciones de fase, y particularmente de la transición vítrea, es determinar si los cambios físicos que se verifican a $T > T_g$ están reflejados en las velocidades de las reacciones químicas, y por lo tanto se planteó que una ecuación similar a la WLF (1) podría aplicarse para describir la dependencia de las velocidades de las reacciones de deterioro con la temperatura en los sistemas en los que haya control difusional. La ecuación (1) planteada para velocidades sería:

$$\text{Log } (k_g/k) = -c_1*(T-T_g)/(c_2+(T-T_g)) \qquad (2)$$

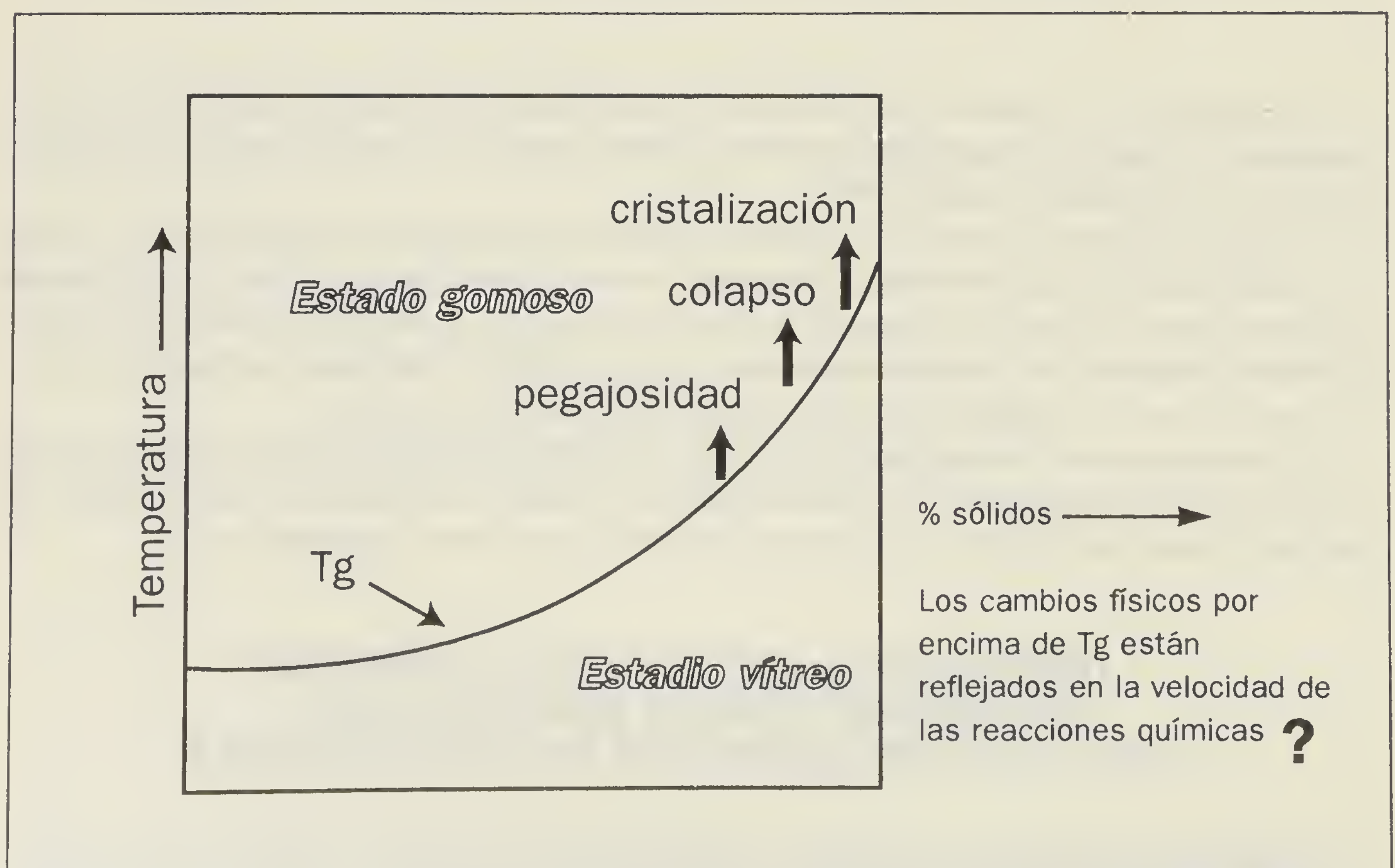



**Figura 1:** Esquema de la variación de $T_g$ con el contenido de sólidos, y cambios físicos que se producen en el estado gomoso.

Donde:

T: temperatura
$T_g$: temperatura de transición vítrea
k: constante de velocidad para una dada reacción a la temperatura T
$k_g$: constante de velocidad a la temperatura $T_g$

En la aplicación de la ecuación (2) para la cinética de reacciones químicas, se supone que hay control difusional y que la difusividad es inversamente proporcional a la viscosidad, que a su vez tiene una dependencia con la temperatura descripta por la ecuación WLF.

En el estudio de la dependencia de las velocidades de reacciones de deterioro en alimentos, tradicionalmente se aplicó la ecuación de Arrhenius:

$$\ln k = \ln k_o - E_a/RT \qquad (3)$$

Donde:

T: temperatura en K
k: constante de velocidad de una dada reacción
$E_a$: energía de activación de la reacción
R: constante de los gases
$k_o$: factor preexponencial (constante para un dado sistema)

En la **Figura 2** se representa esquemáticamente la difusividad en las proximidades de $T_g$ y la aplicación de ambas ecuaciones.

En el estudio de cambios en factores de calidad en alimentos, durante la última década hubo un gran número de trabajos en los que se comparó la validez de la ecuación de Arrhenius (3) versus la ecuación WLF según la ecuación (2). La ecuación (2) fue particularmente muy adecuada para describir la dependencia de la velocidad de los cambios físicos dependientes de la viscosidad en relación con ($T-T_g$), tales como los tiempos de cristalización de azúcares (Roos y Karel, 1991), flujo y pegajosidad (Roos y Karel, 1993).

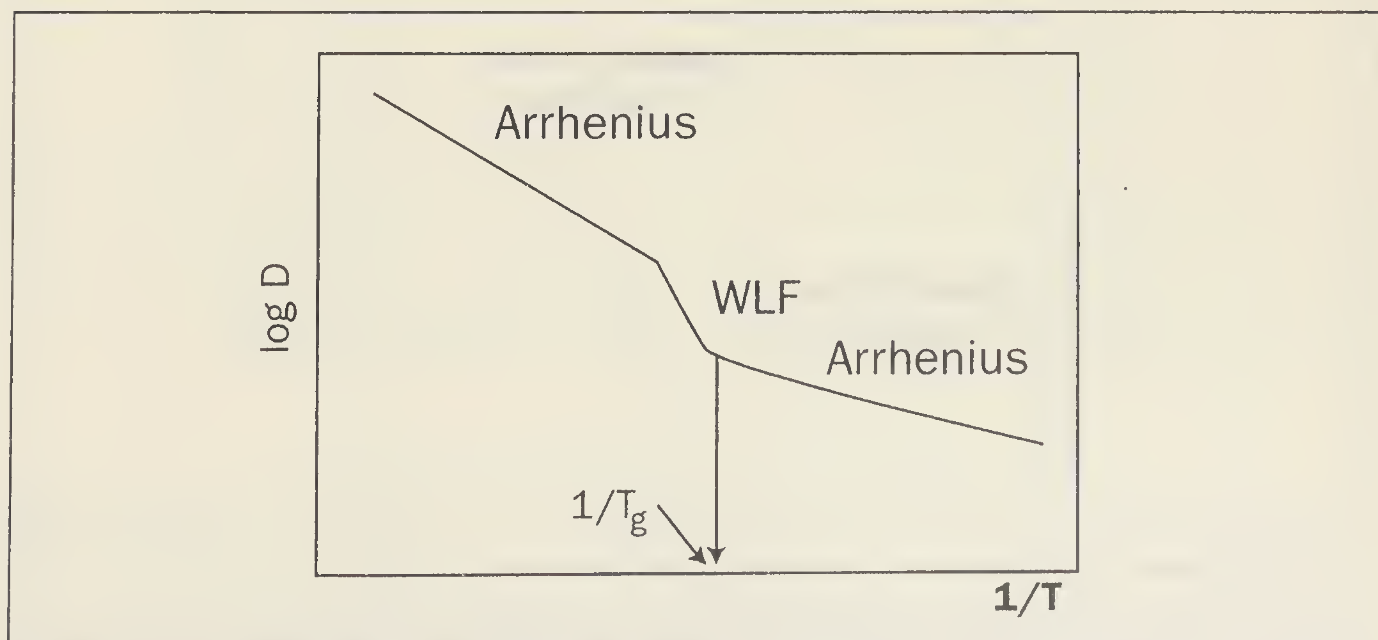



**Figura 2:** Representación esquemática del efecto de la transición vítrea sobre la dependencia de la difusividad, D con la temperatura, indicando las zonas descriptas por la ecuación de Arrhenius y por la ecuación WLF. (Adaptado de Roos, 1995).

Los resultados de estos trabajos indicaron que los coeficientes universales deben emplearse como primera aproximación, cuando no hay datos suficientes de los sistemas, de lo contrario resultó siempre mejor emplear los coeficientes calculados en base a los datos correspondientes a cada sistema particular (Ferry, 1980; Peleg, 1992; Buera y Karel, 1993).

Sin embargo, para las reacciones químicas se encontraron resultados contradictorios. Estas contradicciones se pueden explicar considerando que en realidad hay dos factores que controlan la velocidad global de la reacción (Karel, 1994): el coeficiente de difusión de los reactivos (D) y la cinética de la reacción involucrada (k), que a su vez son ambos dependientes de la temperatura. La cinética de reacción generalmente se puede describir mediante la ecuación (3), pero el coeficiente de difusión puede seguir la ecuación (3), con un cambio de pendiente (o sea, un cambio en el valor de $E_a$) cerca del valor de $T_g$, o la ecuación (2), especialmente en el rango de temperaturas entre 10 y 100 grados por encima de $T_g$. El tipo de ecuación que mejor refleje los cambios observables dependerá, por lo tanto de la influencia relativa de cada uno de estos parámetros.

## MAPAS DE ESTABILIDAD

Los mapas de estabilidad pueden emplearse para relacionar la reactividad de un sistema en función de algún parámetro importante que defina en cada punto, para una condición dada, la estabilidad del mismo.

El parámetro que tradicionalmente se empleó para describir la estabilidad de alimentos fue la actividad de agua ($a_w$). Labuza y col. (1970) definieron un mapa de estabilidad en el que se indicaba esquemáticamente la velocidad relativa de procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos en función de la actividad de agua.

Se propuso (Karel y Saguy, 1991; Slade y Levine, 1991) que las transiciones vítreas afectan las reacciones químicas controladas por difusión de los reactivos, a través del aumento del coeficiente de difusión, y que la variable ($T-T_g$) podría dar cuenta de los efectos de la temperatura y de la humedad simultáneamente (el efecto de la humedad estaría considerado en el valor de $T_g$), y por lo tanto esta variable permitiría establecer mapas de estabilidad más completos que

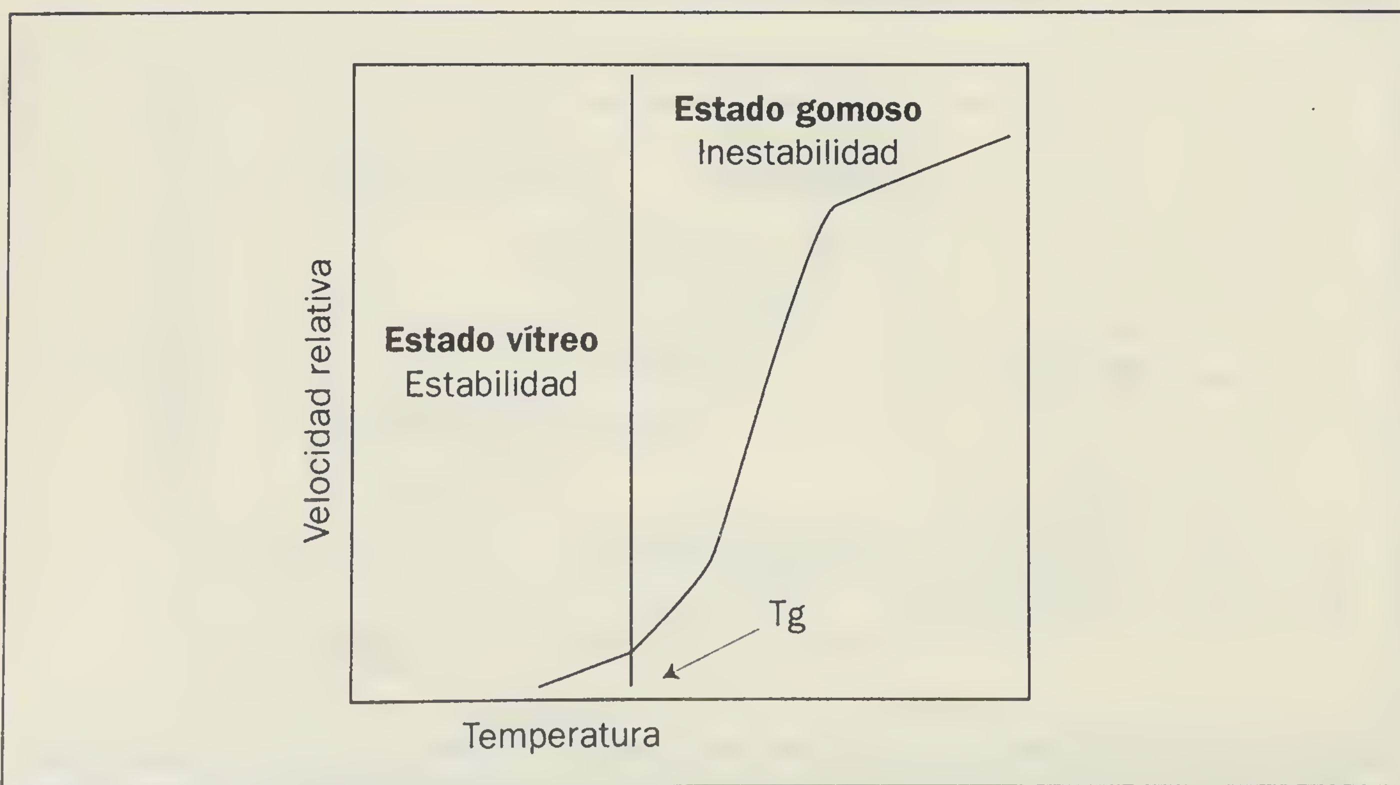



**Figura 3:** Mapa de estabilidad hipotético basado en la variable $T_g$. (Adaptado de Roos, 1995).

los basados en $a_w$ (Levine y Slade, 1993). Si se considera que la estabilidad está relacionada con la transición vítrea del sistema en forma directa, esto permitiría establecer un mapa de estabilidad hipotético, como el de la **Figura 3.**

En los ejemplos siguientes se analizará el efecto de la transición vítrea sobre la velocidad de algunas de las reacciones susceptibles de estar limitadas por la difusión de los reactivos o la movilidad molecular.

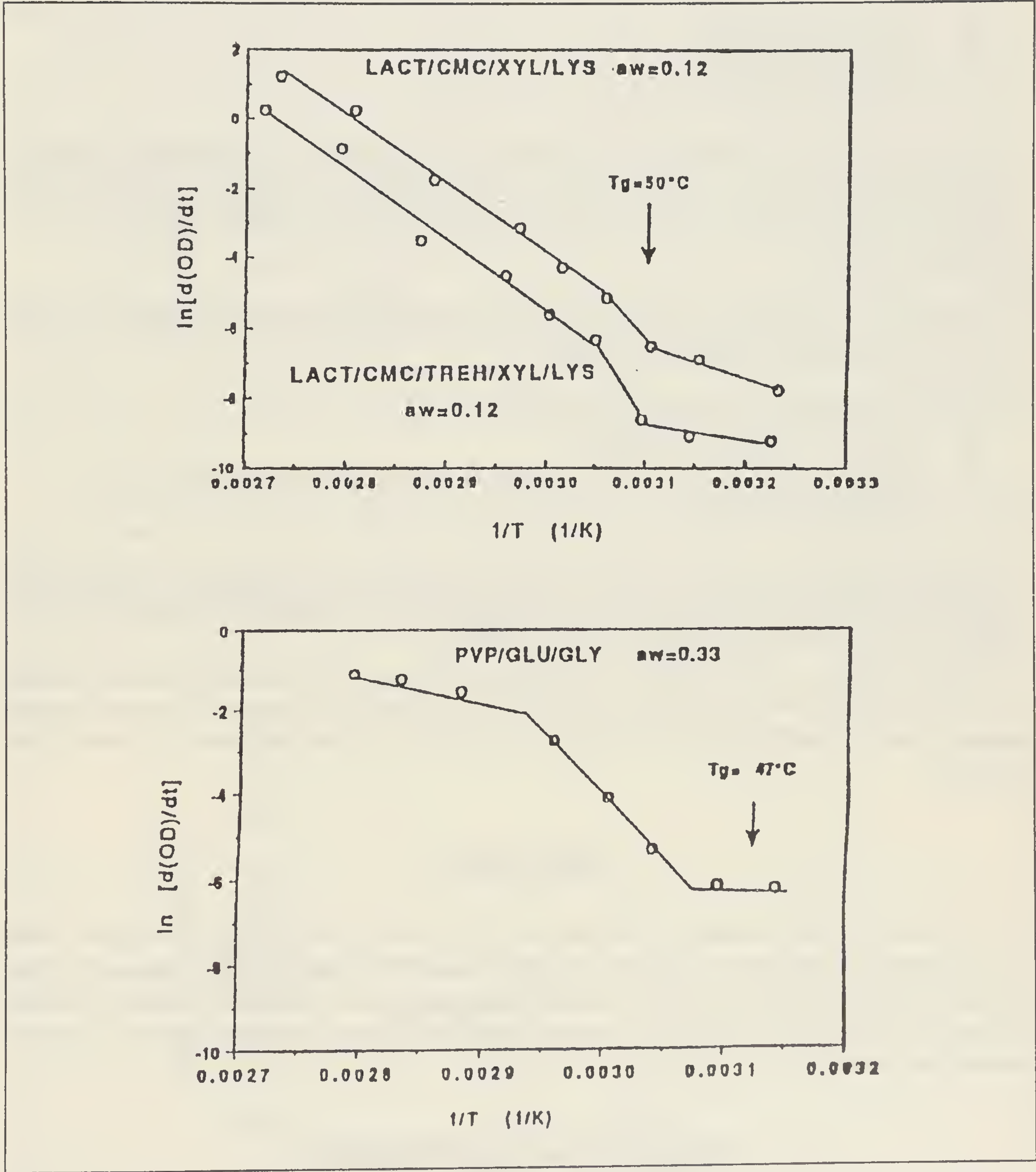



**Figura 4:** Gráficos de Arrhenius para la reacción de pardeo no enzimático en difentes matrices, en las proximidades de las temperaturas de transición vítrea. **k:** constantes de velocidad de orden cero. **T:** temperatura en K. (Adaptado de Karmas y col., 1992). **Lac/CMC/ XYL/LYS:** sistema compuesto por lactosa, carboximetilcelulosa, xilosa y lisina, en proporción 48:48:2:2 respectivamente. **LAC/CMC/TREH/XYL/LYS:** sistema compuesto por lactosa, carboximetilcelulosa, trehalosa, xilosa, lisina 48:48:2:2, respectivamente. **PVP/GLU/GLI:** sistema compuesto por PVP, glucosa y glicina 98:1:1, respectivamente.

# REACCIONES QUIMICAS EN ALIMENTOS QUE SON SUSCEPTIBLES DE ESTAR AFECTADAS POR LA TRANSICION VITREA

1. *Reacciones que pueden estar afectadas por difusión*
Estas reacciones requieren algún grado de movilidad (difusión, coalición) de dos moléculas.

la. Pardeo no enzimático
lb. Oxidación de lípidos
lc. Actividad enzimática

Las dos reacciones de deterioro no enzimáticas más importantes en alimentos, el pardeo no enzimático y la oxidación de lípidos, están a menudo limitadas por difusión. De la misma manera la actividad enzimática, depende de que se puedan encontrar enzima y sustrato en confomaciones adecuadas.

2. *Reacciones que pueden estar afectadas por la movilidad molecular* (intrínseca o de la matriz en la que se encuentran los reactivos)

2a. Desnaturalización térmica de proteínas
2b. Inactivación térmica de enzimas
2c. Pérdida de establidad de otros materiales biológicos (anticuerpos, polen, microorganismos, etc.)

Ya que la desnaturalización térmica de proteínas requiere un reordenamiento especial de las moléculas, podría esperarse que la estabilidad de proteínas, estuviera aumentada en el estado vítreo, en el que la movilidad molecular está disminuida.

Por otro lado, el estado vítreo, caracterizado por una movilidad molecular extremadamente baja podría ser el factor determinante de la estabilización de material biológico (enzimas aisladas, esporas, semillas, polen), los cuales en solución o dispersión tienen vida media muy limitada.

## SISTEMAS

En todos los casos se analizó la cinética de las reacciones mencionadas en sistemas modelo, en los que la matriz vítrea se obtuvo por liofiolización de soluciones que contenían los componentes capaces de formar matrices amorfas. Como matrices se emplearon azúcares (trehalosa, lactosa), o polímeros (PVP, polivinilpirrolidona, un polímero sintético soluble en agua) y maltodextrinas.

## PARDEO NO ENZIMATICO

En estudios realizados con varios sistemas amorfos, el efecto de la transición vítrea se manifestó sobre la dependencia de la velocidad de pardeo con la temperatura por quiebres suaves en el gráfico de Arrhenius a temperaturas cercanas a la de la transición (Karmas y col., 1992) (**Figura 4**). Sin embargo, las energías de activación calculadas en la zona de mayor pendiente, fueron mucho menores que las esperadas en base a la ecuación de WLF. Por ejemplo, si se combina las ecuaciones (2) y (3), para un valor de $T_g$ de 50°C, la energía de activación predicha en

el punto de la transición es del orden de 160 Kcal/mol, y el valor máximo observado en los gráficos de la **Figura 4** es de 60 Kcal/mol para el punto de mayor pendiente. Además, se verificaron efectos específicos de la humedad y/o la temperatura, no incluidos en la variable ($T-T_g$). Buera y Karel (1993) aplicaron la ecuación de WLF para describir la dependencia de la velocidad de reacción de pardeamiento con ($T-T_g$). Los coeficientes hallados fueron distintos de los considerados "universales" para los tiempos de relajación de polímeros, y además estos coeficientes variaban con la humedad del sistema. Por lo tanto, se evidenciaron nuevamente los efectos intrínsecos de la humedad.

Karmas (1994) analizó el efecto de algunos hechos relacionados con la transición vítrea, tales como la cristalización, sobre el desarrollo de pardeamiento. Como se ve en la **Figura 5**, en matrices cristalizables (azúcares) el punto en el que se observó pardeamiento ocurrió en el mismo punto en el que se produjo cristalización de la matriz. En una matriz en la cual la cristalización fue inhibida mediante la incorporación de maltodextrina, la velocidad de pardeo fue menor pero aumentó de una forma más contínua al aumentar la actividad de agua del sistema.

Las curvas de velocidad de pardeamiento no enzimático en función de la actividad de agua, o de la humedad, muestran un máximo a humedades intermedias, cuya ubicación depende del tipo de producto. La baja velocidad de pardeo en la zona de bajas humedades ha sido atribuida a problemas difusionales de los reactivos (Labuza y Saltmarch, 1981), aunque también a que la cantidad de reactivos disueltos es muy pequeña debido a la escasa cantidad de agua presente (Duckworth, 1981). El aumento de las constantes de velocidad de las reacciones de pardeo no enzimático al aumentar la humedad del sistema podría deberse al aumento de la movilidad (Karel y Saguy, 1991).

La **Figura 6a** muestra las constantes de velocidad de orden cero obtenidas para la reacción de pardeamiento ocurrida en matrices de PVP (Buera y Karel, 1995). Las constantes de velocidad se graficaron en función de la humedad y como función de ($T-T_g$). La dependencia de la velocidad con estas variables fue similar a la obtenida con otros sistemas. El máximo de las curvas se corrió hacia más altos valores de humedad cuando la masa molar del la matriz aumenta-

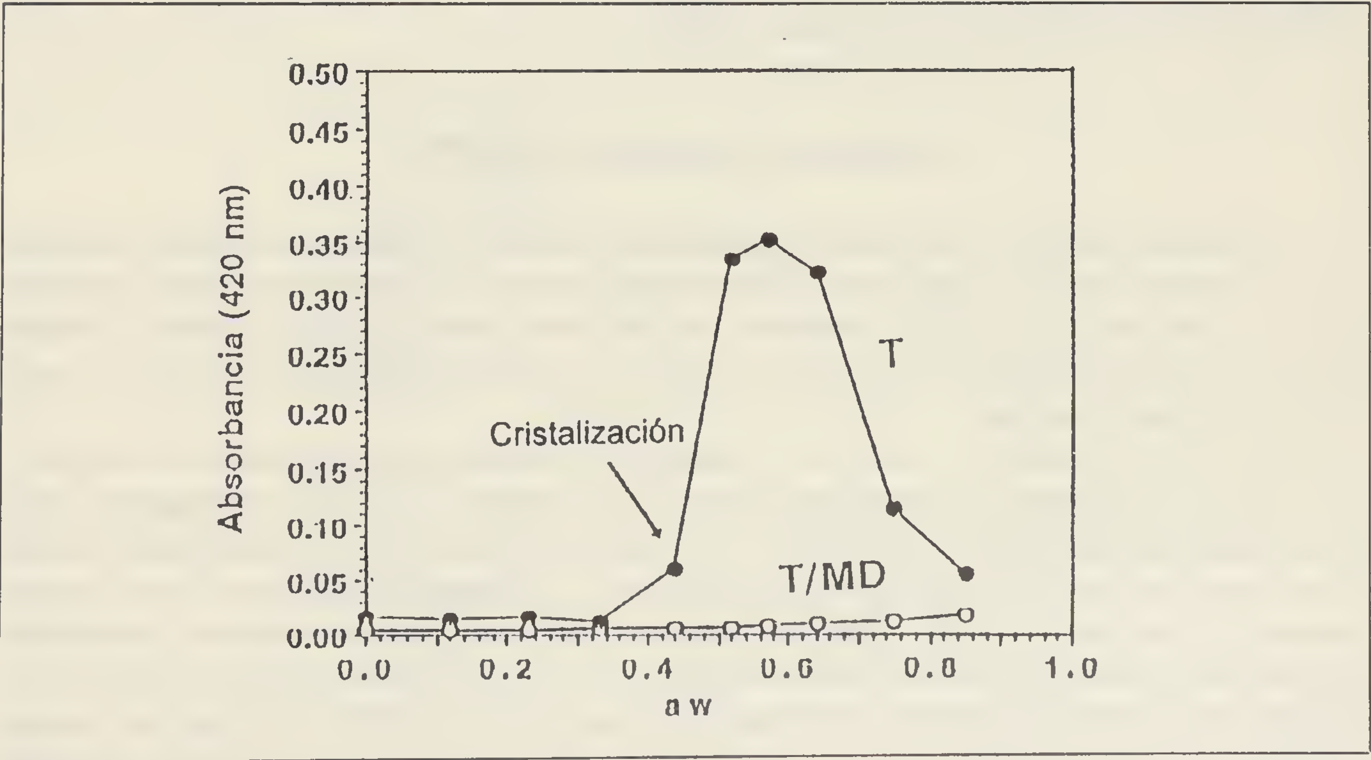



**Figura 5:** Desarrollo de pardeamiento (medido como absorbancia a 420 nm) en una matriz de trehalosa (T), cristalizable a $a_w$ -0,44 y en una matriz de maltodextrina/trehalosa (MD/T), en la que se inhibió la cristalización. El amacenamiento fue realizado a 20°C durante cuatro semanas. (Datos de Karmas, 1994).

ba. En los gráficos en función de la variable ($T-T_g$), las curvas para las tres matrices tuvieron su máximo a aproximadamente el mismo valor de ($T-T_g$), lo que sugirió que la ubicación del máximo podría estar relacionada con las características físicas de la matriz . Por otro lado, para el mismo valor de $a_w$ la velocidad de reacción dependió de la masa molar del polímero. Resultados similares obtuvo Bell (1996) (**Figura 6b**) también para sistemas de matrices poliméricas de PVP, utilizando glucosa y lisina en pequeña cantidad como reactivos. Además, observó que aún en estado vítreo ($a_w$-0,33), había suficiente movilidad como para que las moléculas de reactivos difundieran y reaccionaran (Bell, 1996). Segun puede observarse en la **Figura 6** (**a y b**), al pasar al estado gomoso, para valores de ($T-T_g$) entre -20°C y 20°C la velocidad de reacción aumentó entre seis y siete veces, lo cual fue mucho menor que el aumento observado para la movilidad de una sonda de prueba según un estudio realizado por ESR (Roozen y col., 1991). Al atravesar la región de la transición la movilidad de esta prueba aumentó cien veces, y el aumento de velocidad al pasar de $T_g$ a $T_g$ +10°C, predicho por combinación de las ecuaciones (2) y (3) para un valor de $T_g$ de 50°C, es del orden de 500 veces.

En sistemas de matrices poliméricas de PVP, almidón gelatinizado y maltodextrinas anhidros, se observó pardeamiento no enzimático luego del almacenamiento a temperaturas mucho menores que $T_g$ (Schebor y col., 1997a). Es particularmente interesante resaltar que para estos sistemas anhidros, ni la teoría basada en requerimientos de solubilidad de los reactivos ni la basada en requerimientos de movilidad pueden explicar el comportamiento. Es posible que cuando la temperatura de almacenamiento es relativamente elevada (en este caso fue de 90°C), es la variable T, más que ($T-T_g$) la que determina la posibilidad de pardeo en este tipo de sistemas.

En todos estos estudios analizados, la transición vítrea influyó sobre la velocidad de reacción, pero no en el grado esperado para una reacción bimolecular como la reacción de pardeo, que requiere difusión y colisión de los reactivos y luego difusión de los productos. Este efecto menos notorio que el esperado demuestra que hay factores intervinientes, ajenos al fenómeno de la transición vítrea que determinan la posibilidad de las reacciones. En reacciones complejas como las de pardeamiento, que se debe a muchos pasos de reacción secuenciales es probable que la dependencia con la temperatura no pueda ser descripta completamente ni por la ecuación WLF (2) ni por Arrhenius (1) (Karel, 1994).

## OXIDACION DE LIPIDOS

La formación de una matriz vítrea constituida por hidratos de carbono es de gran importancia en la encapsulación de "flavors" y en la protección contra la oxidación de lípidos emulsificados en alimentos en polvo. Los compuestos encapsulados pueden liberarse debido al colapso (que es una consecuencia de la transición vítrea) y esto resulta en pérdida de "flavors" y exposición de lípidos al oxígeno.

El efecto de la transición vítrea en la velocidad de oxidación de metil linoleato encapsulado en una matriz amorfa de lactosa fue estudiado por Shimada y col. (1991). Cuando los lípidos insaturados encapsulados se sometieron a un almacenamiento a $T-T_g$, se produjeron oxidaciones coincidentes con la cristalización del azúcar, y cuya magnitud aumentó a medida que aumentó el valor de ($T-T_g$). Sin embargo, estructuras colapsadas pueden mantener compuestos encapsulados y protegerlos de su liberación debido a la alta viscosidad del medio colapsado. Labrousse y col. (1992) extendieron el estudio de Shimada y col. (1991) a sistemas no cristalizables. En este caso, un tratamiento a temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea provocaba colapso estructural de la matriz, con la consiguiente pérdida de porosidad, que tuvo efecto protector de los lípidos encapsulados contra la oxidación (**Figura 7**). Probablemente ocurrió re-encapsulación y la difusión de oxígeno se vió dificultada en la matriz densamente colapsada.

# DEGRADACION DE ACIDO ASCORBICO

Nelson (1993) observó que la degradación de ácido ascórbico ocurría en una matriz amorfa de maltodextrina a $T < T_g$, probablemente por oxidación, debido al pequeño tamaño de la molécula de oxígeno. La cinética fue afectada por cambios estructurales, pero la ecuación WLF no describió adecuadamente la dependencia de la velocidad de degradación con la temperatura. A bajas actividades de agua, los gráficos de Arrhenius presentaron quiebres (de igual forma que los de Karmas y col. (1992) para las reacciones de pardeamiento, **Figura 3**), y las energías de activación fueron mayores a $T > T_g$ que a $T < T_g$. El valor de la $E_a$ es generalmente mayor a $T < T_g$, debido justamente a efectos difusionales. La disminución en el valor de la energía de activación se atribuyó al colapso estructural que fue evidente a $T > T_g$. La matriz colapsada, probablemente protegió al ácido ascórbico de la degradación debido a las dificultades del oxígeno para penetrar su superficie.

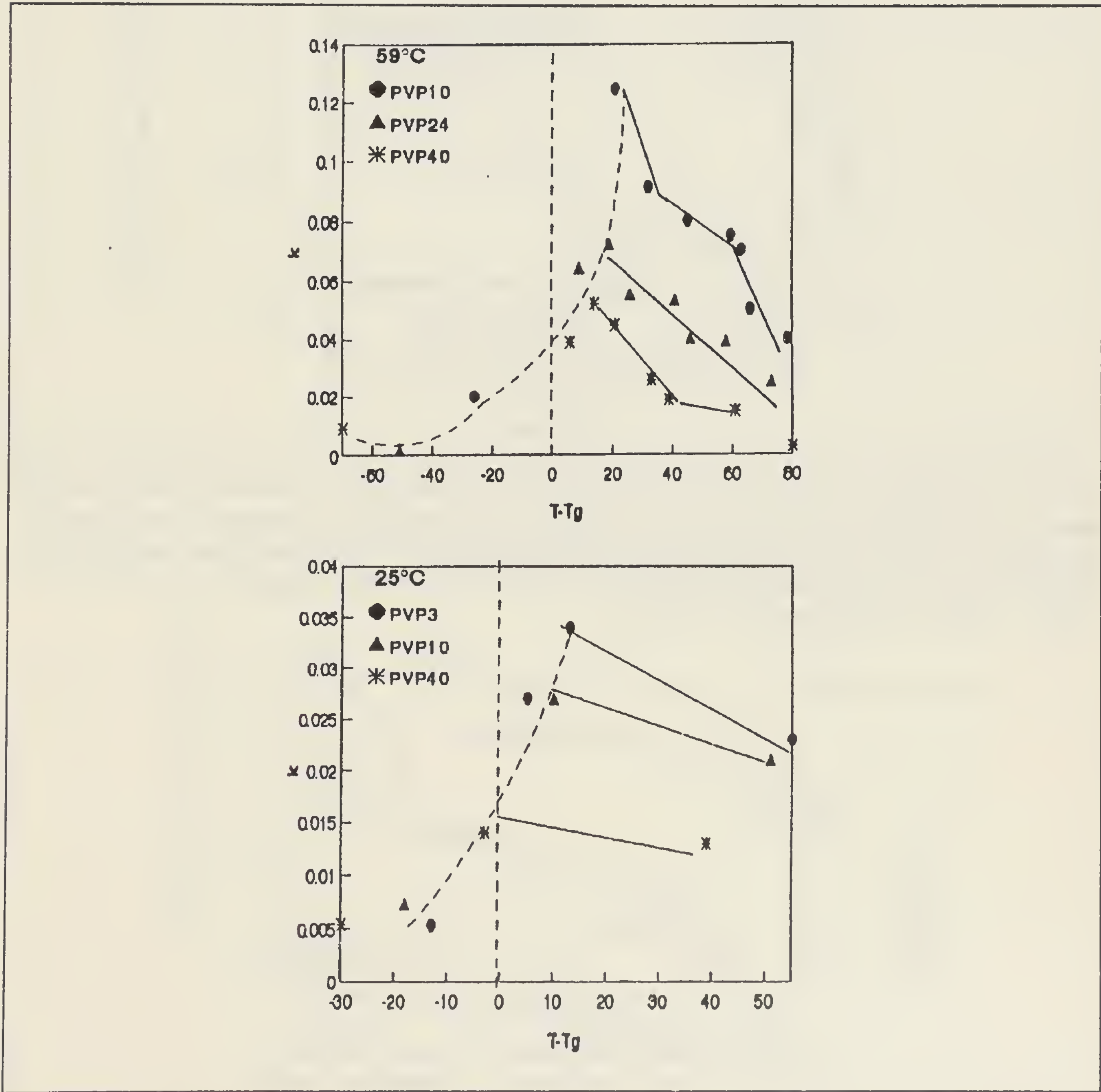



**Figura 6:** Constantes de velocidad de orden cero obtenidas para la reacción de pardeamiento no enzimático en matrices de PVP de distinta masa molar. **(a)** Datos de Buera y Karel, 1995. **(b)** Datos de Bell, 1996. PVP 3, 10, 24, 40, 100: polivinil pirrolidona de masa molar 3.000, 10.000, 24.000 y 40.000, respectivamente.

## ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad enzimática tiene una $a_w$ crítica a partir de la cual es detectable. Careri y col (1980) observaron que el cambio en capacidad calorífica (que indica el punto de la transición vítrea) y el aumento de movilidad de las moléculas de enzima coincidieron con el punto en que se detectó actividad enzimática, lo cual indicaría que podría existir una relación entre actividad enzimática y transición vítrea.

Sin embargo, en matrices de almidón a diferentes valores de (T- $T_g$) se registró actividad de invertasa en el estado vítreo, como indica la **Figura 8**. Se trabajó a varias condiciones de humedad, correspondientes a $a_w$ entre 0,11 y 0,97, y a temperaturas compatibles con la actividad

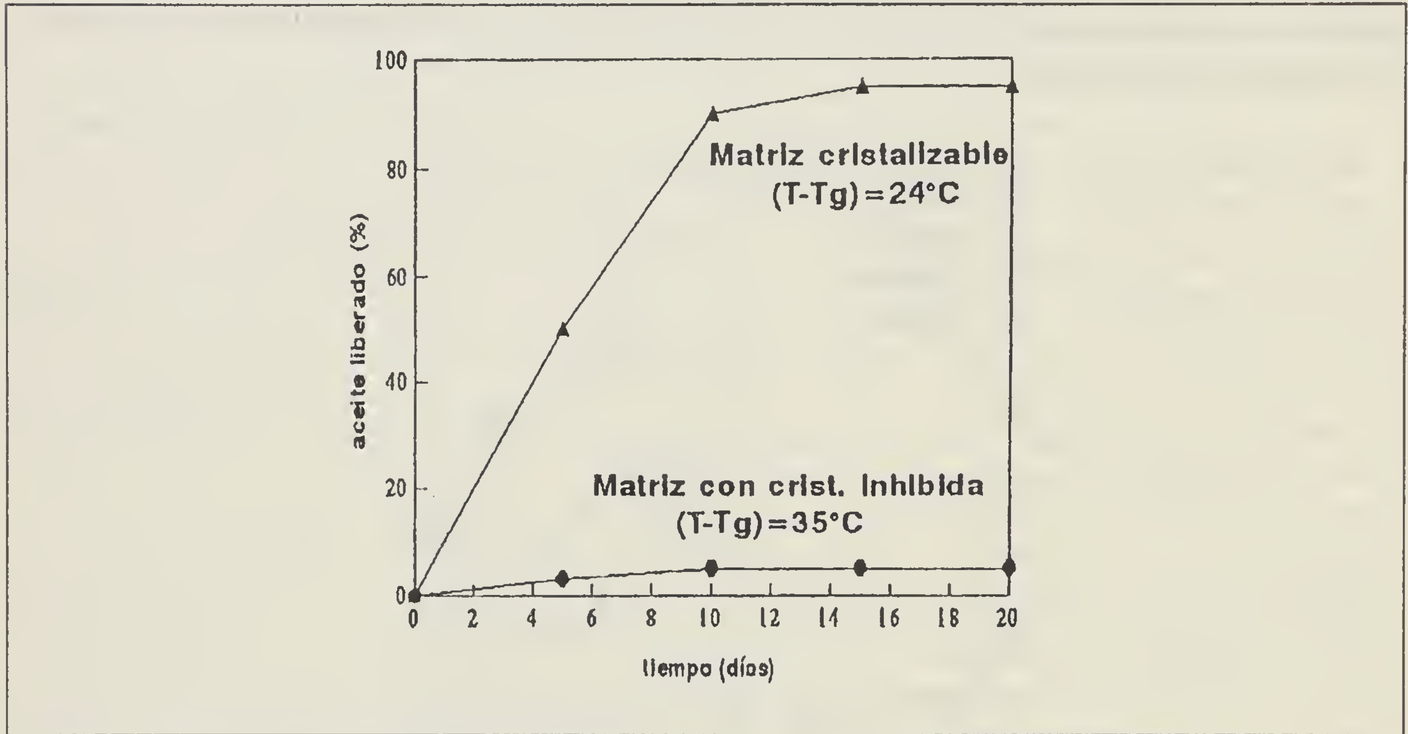



**Figura 7:** Liberación de linoleato de metilo en una matriz cristalizable (lactosa) y una matriz de cristalización inhibida (lactosa/sacarosa/gelatina) luego del almacenamiento por encima de la temperatura de transición vítrea. La matriz no cristalizable mostró un grado muy significativo de colapso. (Datos de Labrousse y col., 1992).

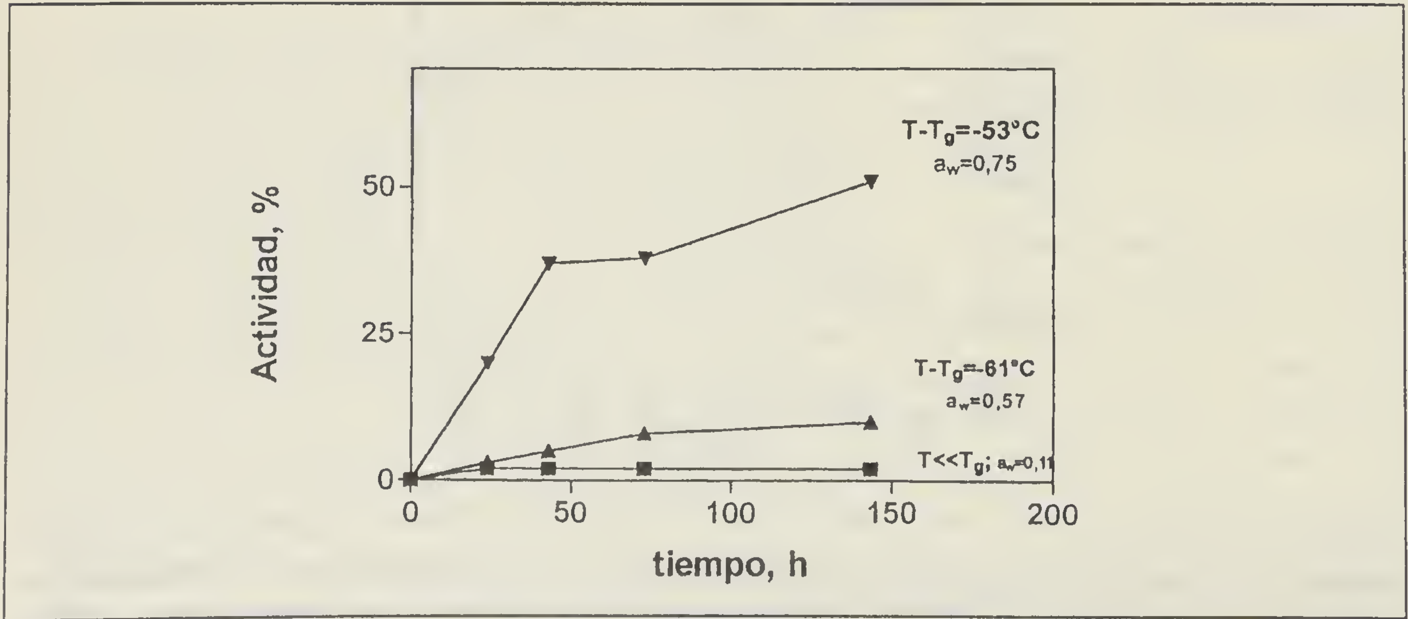



**Figura 8:** Actividad de la enzima invertasa en el estado vítreo luego del almacenamiento a 37°C en matrices de almidón. (Datos de Schebor y col, 1995).

enzimática (25 a 50°C). La actividad enzimática ocurrió además por debajo del punto de movilización de sacarosa cristalina, que corresponde a un valor de $a_w$ de 0,85 (Duckworth, 1981), lo cual confirma el estado amorfo de sacarosa en los sistemas.

La actividad enzimática en una matriz en estado vítreo puede explicarse como debida a que la rotación de grupos peptídicos relativamente pequeños no está impedida en ese estado. En una matriz vítrea de lisozima la actividad enzimática estuvo directamente relacionada con la movilidad de los grupos peptídicos, que habían sido marcados con sondas paramagnéticas (Lillie y Gosline, 1993). Por otro lado, pequeños movimientos debidos a relajaciones ocurren en el estado vítreo y son la causa de la maduración del vidrio o "ageing" (Hay, 1993).

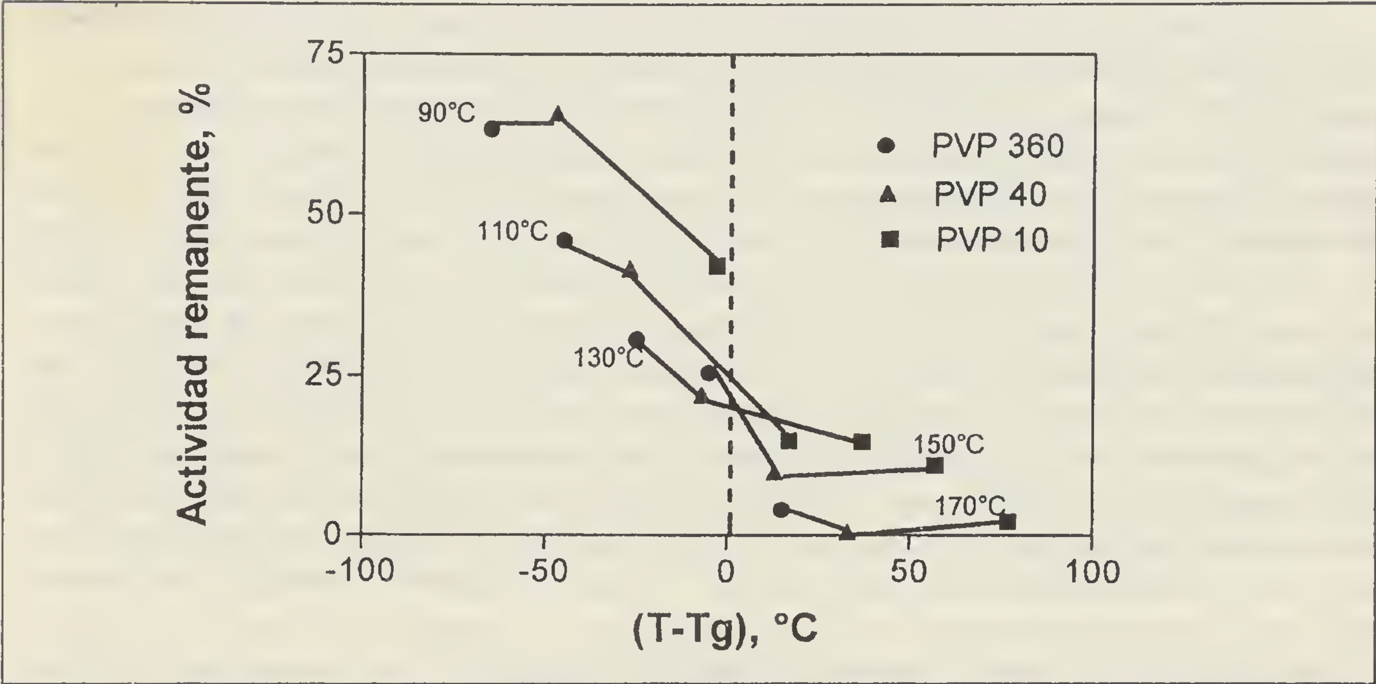



**Figura 9:** Actividad remanente de invertasa en sistemas de PVP de distinta masa molar, luego de 3h de almacenamiento a varias temperaturas (Datos de Schebor y col., 1997b).

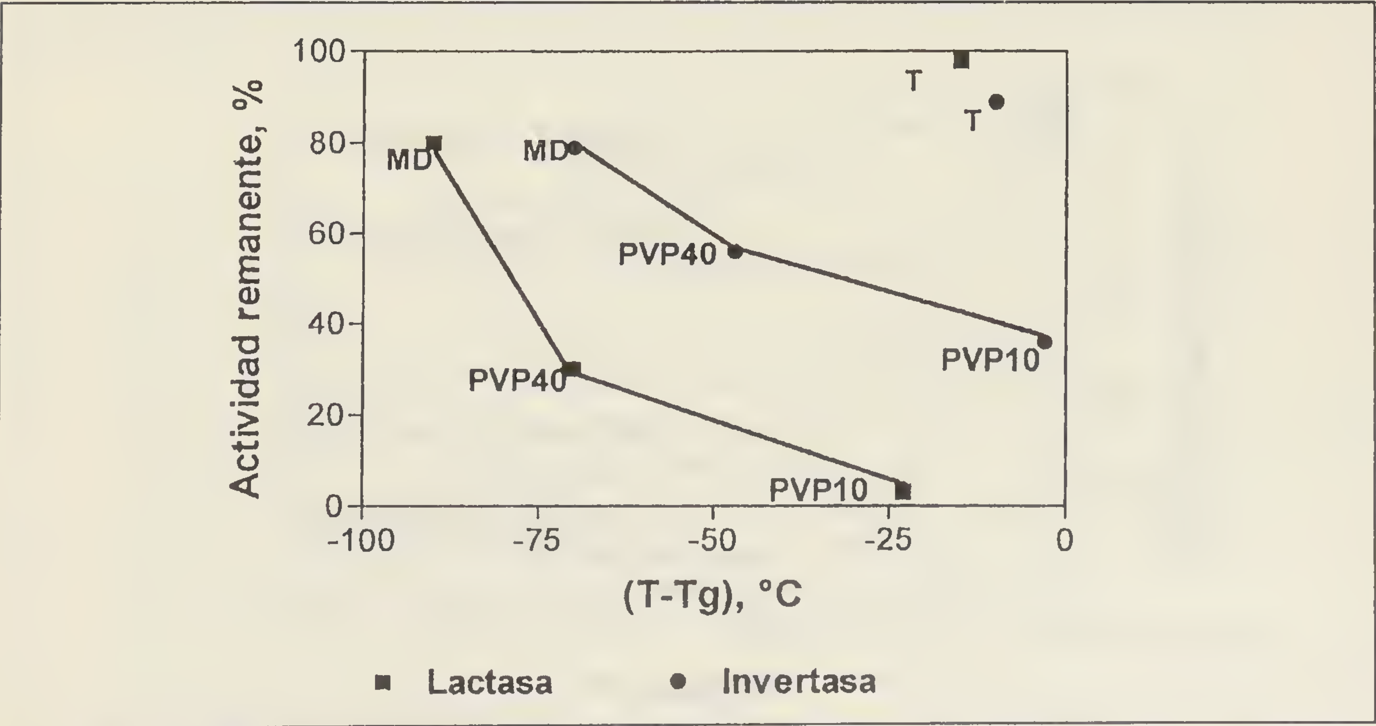



**Figura 10:** Actividad remanente de invertasa y lactasa luego de su almacenamiento en distintas matrices vítreas en función de (T- $T_g$) para humedad casi "0". **T:** trehalosa; **MD:** maltodextrina; **PVP10:** polivinilpirrolidona de masa molar = 10.000. **PVP40:** polivinilpirrolidona de masa molar = 40.000. (Datos de Cardona y col., 1996).

# RESISTENCIA TERMICA ENZIMATICA

La **Figura 9** muestra la actividad remanente de invertasa luego de 3h de calentamiento a diferentes temperaturas y en condiciones anhidras en matrices de PVP de distinta masa molar, y, por lo tanto de distinto valor de $T_g$. Hubo una pérdida considerable de actividad enzimática aún luego del tratamiento en condiciones en que el sistema estaba en estado vítreo. A una dada temperatura, la enzima estuvo más protegida en la matriz de más alta $T_g$. Es interesante notar el efecto intrínseco de la temperatura, que solapa el efecto de la transición vítrea. Este efecto específico puede observarse para un dado valor de ($T$-$T_g$) las muestras a mayor T, pierden actividad más rápidamente.

Se pensó que el efecto protector especial ejercido sobre enzimas y otros biomateriales lábiles por algunas sustancias, como trehalosa y otros disacáridos durante el secado (Arakawa y Timasheff, 1982; Uritani y col., 1995) estaba relacionado con la propiedad de generar matrices vítreas (Crowe y col., 1992; Colaco y col., 1990; Slade y Levine, 1991a,b; Leslie y col., 1995). La **Figura 10** muestra la actividad remanente de dos enzimas (invertasa y lactasa) luego de su almacenamiento en distintas matrices vítreas en función de ($T$- $T_g$) para humedad casi "0" (previo a su tratamiento, las muestras fueron colocadas en desecadores con $P_2O_5$ durante una semana). La actividad remanente estuvo relacionada con los valores de ($T$-$T_g$) para las matrices poliméricas, pero en la matriz de trehalosa las enzimas conservaron su actividad en un grado mayor al esperado en base a los resultados obtenidos con los polímeros. Esto indica un efecto específico protector ejercido por trehalosa, distinto de de su capacidad de generar matrices vítreas. Otros experimentos (Cardona y col., 1996) demostraron que dicho efecto protector se pierde cuando ocurre la cristalización del azúcar (**Figura 11**), lo cual significa que existe un efecto indirecto de la transición vítrea a través de su efecto sobre la velocidad de cristalización. Sin embargo, en el caso del azúcar trehalosa la cristalización no es completa hasta que no se alcanza la cantidad de agua necesaria para su cristalización, que es del 10% p/p, ya que cada molécula de trehalosa cristaliza con dos moléculas de agua. Por lo tanto, puede continuar con su acción protectora a pesar de hallarse en estado gomoso.

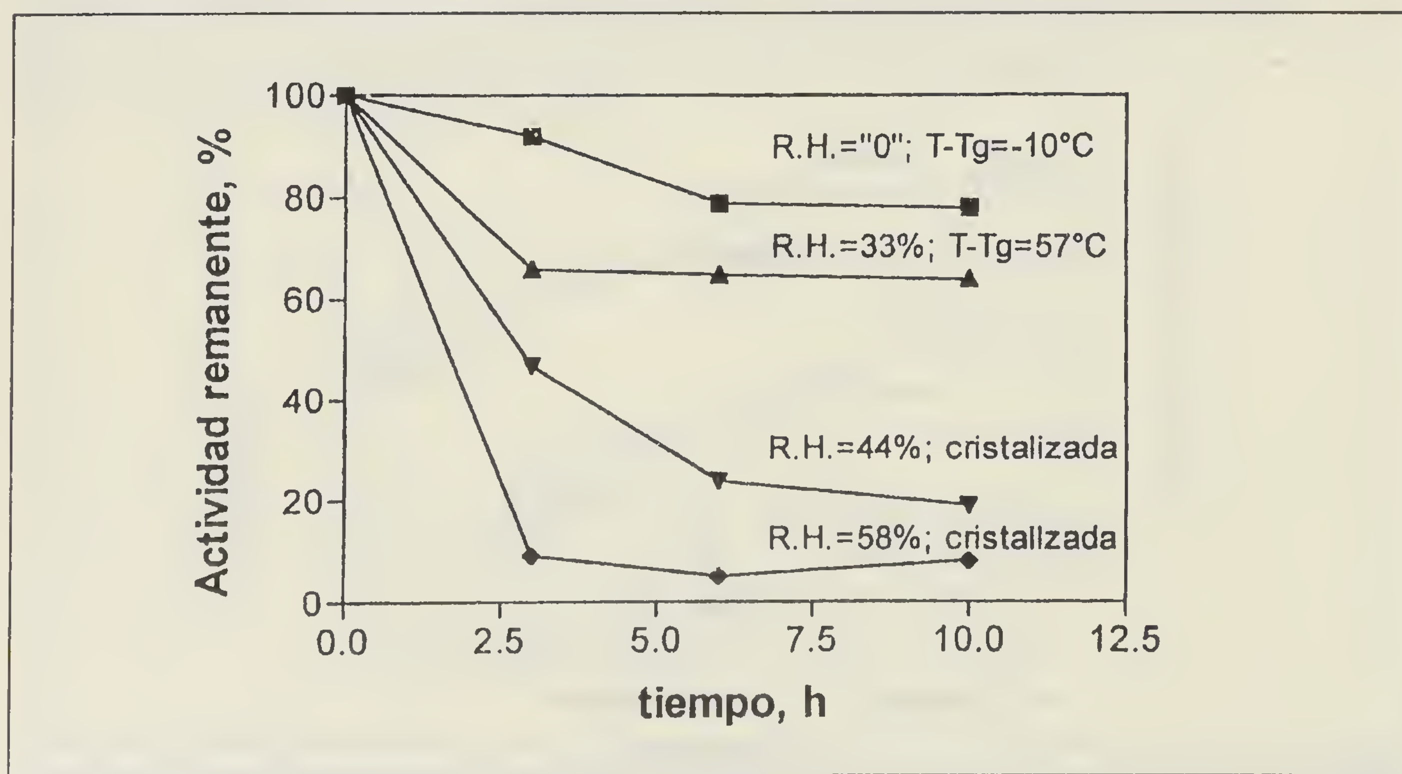



**Figura 11:** Actividad remanente de invertasa liofilizada en una matriz de trehalosa y almacenada a distintas humedades a 90°C, mostrando la pérdida del efecto protector cuando ocurre la cristalización del azúcar. (Datos de Cardona y col., 1996).

## CONCLUSIONES

Todas las reacciones de deterioro estudiadas pudieron ocurrir en el estado vítreo.

Una explicación podría basarse en que la rotación molecular puede ocurrir en vidrios. Si bien la reactividad química está más ligada a difusión translacional, en estudios realizados con sondas paramagnéticas, se vió que la actividad enzimática estaba relacionada con la rotación de grupos peptídicos de la molécula enzimática (Lillie y Gosline, 1993). Por otro lado, la difusión sería posible a través de poros o defectos del material. Además, la maduración del vidrio (o "ageing") es un hecho conocido y es responsable de fenómenos de relajación en estado vítreo (Hay, 1993).

**En el estado vítreo** algunas reacciones estuvieron afectadas por la variable ($T- T_g$).

Las reacciones químicas analizadas en las proximidades de la temperatura de transición no mostraron claramente una cinética que pueda describirse mediante la ecuación WLF (ecuación 2), pero ciertas desviaciones en los gráficos de Arrhenius indicaron que ningún modelo sencillo puede aplicarse. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Karel (1994), en el sentido de que intentar modelar la situación compleja de una reacción de deterioro mediante un modelo sencillo puede llevar a extrapolaciones no adecuadas.

Se observó que el disacárido trehalosa aporta un efecto protector específico para las enzimas, que no está directamente relacionado con su capacidad de generar matrices vítreas. Sin embargo, la transición vítrea podría afectar indirectamente la velocidad de las reacciones de inactivación enzimática, a través de sus efectos sobre la cristalización.

La temperatura de transición vítrea debe considerarse entre las variables necesarias para analizar la estabilidad química de los sistemas, pero no como único valor umbral.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires y el CONICET, como así también la colaboración de las Licenciadas Carolina Schebor, Leila Burin y Florencia Mazzobre.

## BIBLIOGRAFIA


— Arakawa, T. y Timasheff, S. N., 1982. *Stabilization of protein structure by sugars.* Biochem. 21:6536.

— Bell. L., 1996. *Kinetics of nonenzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition.* Food Res. Int.

— Buera, M. P.; Karel, M., 1993. *Application of the WLF equation to describe the combined effects of moisture, temperature and physical changes on non-enzymatic browning rates in food systems.* Journal of Food Processing and Preservation 17:31-45.

— Buera, M. P. y Karel, M.; 1995. *Effect of physical changes on the rates of non-enzymatic browning and related reactions.* Food Chemistry 52:167-163.

— Cardona, S.; Schebor, C.; Buera, M. P., Karel, M. y Chirife, J., 1996. *Thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state and role of trehalose crystallization.* Journal of Food Science 61: 105-112.

— Careri, G.; Gratton, E.; Yang, P. H. y Rupley, J. A., 1980. *Correlation of IR spectroscopic, heat capacity, diamaggnetic susceptibility and enzymatic measurements of lysozyme powder.* Nature. 284:572-573.

— Colaço, C., Sen S., Thangavelu M. Pinder S. and Roser B., 1992. *Extraordinary sta-*

*bility of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology.* Bio/technology. Vol.10.

— CROWE, J. H., CARPENTER, J. F., CROWE, L. M. AND ANCHORDOGUY, T. J., 1990. *Are freezing and dehydration similar stress vector? A comparison of made of interaction of stabilizing solutes with biomolecules.* Cryobiolgy. 27:219-225.

— DUCKWORTH, R. B., 1981. *Solute mobility in relation to water content and water activity. In water activity: Influences of food quality,* p. 295. Academic Press, San Francisco.

— FERRY, J. D., 1980. Viscoelastic properties of polymers. John Wiley & Sons, New York.

— FLINK, J. M. Y KAREL, M., 1972. *Mechanisms of retention of organic volatiles in freeze-dried systems.* J. Food Technol. 7: 199.

— HAY, J. N., 1993. *Physical ageing in polymer blends.* En: The Glassy State in Foods. Blanshard y Lillford eds. Nottingham University Press. Loughborough.

— KAREL, M., 1994. *Temperature-dependence of food deterioration processes.* J. Food Science. 58:ii. (letters).

— KAREL, M; ANGLEA, S.; BUERA, M. P., LEVI, G. Y ROOS, Y., 1994 *Stability-related transitions of amorphous foods.* Thermochimica Acta. 246:249-269.

— KAREL, M., ROOS, Y. AND BUERA, M. P., 1993. *Effects of glass transitions on processing and storage.* In: "Glassy State in Food", ed. by J. M. V. Blanshard and P. J. Lillford, Nottingham University Press, Loughborough, England.

— KAREL, M. AND SAGUY, I.,1991. *Effects of water in food systems.* In Water relationships in foods. Levine, H. Slade L. Eds.; Plenum Press: New York, pp 157-174.

— KARMAS, R., BUERA, M. P., KAREL, M., 1992. *Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems.* J. of the Agricultural and Food Chem. 40:873-879.

— KARMAS, R., 1994. *The effect of glass transition on non-enzymatic browning in dehydrated food systems.* Doctor of Philosophy Thesis, Rutgers, the State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey (U. S. A.).

— LABROUSSE, S.; ROOS. Y., KAREL, M. 1992. *Collapse and crystallization in amorphous in amorphous matrices with encapsulated compounds.* Sciences des Aliments. 12:757769.

— LABUZA,T. P.; TANNENBAUM, S. R. AND KAREL, M., 1970. *Water content and stability of low-moisture and intermediate moisture foods.* Food Technol. 24: 543-550.

— LE MESTE, M.; VIOLLEY, A.; COLAS, B., 1991. *Influence of water on the mobility of small molecules dispersed in a polymeric system.* En: Water relationships in foods. H. Levine y L. Slade eds., Plenum Press, N. Y. and London.

— LESLIE, S. B., ISRAELI, E.; LIGHTHART,.B.; CROWE, J. H. Y CROWE, L. M., 1995. *Trehalose and succrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.* Applied and Environmental Microbiology. 61:3592- 3597.

— LEVINE, H.; SLADE, L., 1989. *A food polymer science approach to the practice of cryostabilization technology.* Comments Agric. and Food Chem. 1:315-396.

— LEVINE, H. AND SLADE, L., 1992. *Glass transitions in foods.* En: "Physical Chemistry of Foods", ed. by H. G. Schwartzberg and R. W. Hartel, Marcel Dekker, Inc. New York., pp. 83-220.

— LILLIE, M. A. Y GOSLINE, J. M., 1993. *The effects of swelling solvents on the glass transition of elastin and other proteins.* En "The Glassy State of Foods" Blanshard y Lillford eds., Nottingham University Press, Loughborough.

— MAZZOBRE, M. F.; BUERA, M. P. Y CHIRIFE, J., 1997. *Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallization.* Lebensmittel Wiss. und Technologie. 30:324-329.

— MAZZOBRE, M. F.; BUERA, M. P. Y CHIRIFE, J., 1997. *Glass transition and thermal stability of lactase in low-moisture amorphous polymeric matrices.* Biotechnology Progress. 13: 195-199.

— NELSON, K. A., 1993. *Reaction kinetics of food stability: comparison of glass transition*

*and clasical models for temperature and moisture dependence.* Doctor of Philosophy Thesis. University of Minnesota.
— Roos, Y. and Karel, M., 1990. *Differential scanning Calorimetry study of phase transitions affecting quality of dehydrated materials.* Biotechnol. Prog. 6: 159- 163.
— Roos, Y., Karel, M., 1991. *Plasticizing effect of water on thermal behavior and crystallization of amorphous food models.* J. Food Science. 56(1):38-43.
— Roos, Y and Karel, M., 1992. *Crystallization of amorphous lactose.* J. Food Science. 57: 775-777.
— Roos, Y. (1995) *Phase transitions in foods.* Academic Press, Inc. N. Y., San Diego, CA.
— Roozen, M. J.; Hemminga, G. W. y Walstra, P., 1991. *Molecular motion in watermalto oligosaccharyde mixtures as studied by conventional and saturation transfer spinprobe E. S. R. spectroscopy.* Carbohyd. Res. 215:229-237.
— Roser, B. 1991. *Trehalose, a new approach to premium dried foods.* Trends in Food Science & Technology. 166- 169.
— Schebor, C.; Buera, M. P. y Chirife, J., 1995. *Efecto de la transición vítrea sobre la actividad de la enzima invertasa en sistemas amorfos de humedad reducida.* Resúmenes XI Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Viña del Mar, Chile, 15 al 17 de octubre de 1995.
— Schebor, C.; Buera, M. P. y Chirife, J., 1996. *Glassy state in relation to thermal inactivation of enzyme invertase in amorphous dried matrices of trehalose, maltodextrin and PVP.* Journal of Food Engineering. 30:269-282.
— Schebor, C.; Buera, M. P. y Chirife, J., 1997a. *Color formation due to nonenzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous model systems.* Enviado a Biotechnology Progress.
— Schebor, C; Terebiznik, M.; Mazzobre, F.; Burin, L; Pilosof, A. M., Buera, M. P. y Chirife, J., 1997b. *Collaborative study on thermal stability of several food-enzymes in reducedmoisture saccharyde and bioplymer matrices, in relation to glassy state and sugar crystallization.* Abstract Institute of Food Technologists Annual Meeting. Orlando, 14 al 18 de junio de 1997.
— Shimada, Y., Roos, Y. and Karel, M. (1991). *Oxidation of methyl linoleate encapsulated in amorphous lactose-based food models.* J. Agr. Food Chem. 39: 637-641.
— Slade, L.; Levine, H., 1991a. *Beyond water activity: Recent advanced based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety.* CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30:115.
— Slade, L. and Levine, H., 1991 b. *A food polymer science approach to structure-property relationships in aqueous food systems.* In: “Water Relationships in Foods”, ed. by H.; Levine and L. Slade, Plenum Press, New York, pp. 29101.
— Slade, L.; Levine, H.; Finey, J. *Protein-water interactions: water as a platicizer of gluten and other protein polymers.* In Protein quality and the effects of processing; Phillips, R D.; Finlay, J. W., eds.; Dekker, New York, 1989, pp 9-123.
— Tsouroflis, S., Flink, J. M and Karel, M. (1976). *Loss of structure in freeze-dried carbohydrate solutions: Effect of temperature, moisture content and composition.* J. Sci. Food Agric. 27: 509-519.
— Uritani, M; Takai, M., Yoshinaga, K., 1995. *Protective effect of disacchalides on restriction endonucleases during drying under vacuum.* J. Biochem. 117:774-779.
— White, G.; Cakebread, S. H., 1966. *The glassy state in certain sugar-containing food products.* J. Food Technol. 1: 73.
— *Williams, M. L, Landel, R. F. and Ferry, J. D., 1955. The temperature dependence of relaxation mechanisms in amorphous powders and other glass-forming liquids.* J. Am. Chem. Soc. 77:3701-3707.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (87 - 91)

# DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF ISOPRENOID DERIVATIVES AS INHIBITORS OF *Tripanosoma cruzi* REPLICATION

*Juan B. Rodríguez, Eduardo G. Gros*

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.

*Angel M. Stoka*

Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. M. Fatala Chaben" (INDIECH), Paseo Colón 568, (1063) Buenos Aires, Argentina.

## ABSTRACT

Several isoprenoid derivatives were synthesized and evaluated as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes) cells. These compounds were envisioned by modifying the leader structures **1 - 3**, which seemed to be good candidates for Chagas' disease surveillance and the starting point for the design of new drugs.

## RESUMEN

Varios derivados de tipo isoprenoide fueron sintetizados y evaluados, *in vitro*, como inhibidores del crecimiento del parásito responsable de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, en su forma epimastigote.

Algunos de esos productos proporcionaron valores de inhibición aceptables como para ser utilizados en el control del desarrollo del parásito.

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

Chagas' disease or American trypanosomiasis is a serious health problem that affects millions of people in Central and South America[1]. The causative agent for this disease is the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* which is transmitted in rural areas to humans and mammals by Reduviid bugs such as *Rhodnius* and *Triatoma* species, and, in large urban centers, by transfusion of infected blood. Despite of the important advances made in chemotherapy, new compounds are needed because the two drugs presently in use, *Nifurtimox* (4-([5-nitrofurfurylidene]-amino)-3-methylthiomorpholine-1, 1-dioxide) and *Benznidazole* (N-benzyl-2-nitro-1-imidazoleacetamide), cause severe side effects and lack of specificity in all stages of the disease [2,4]. The differences between the metabolic pathways of the parasite and its mammalian host, the mode of action of trypanocidal agents and the knowledge of *T. cruzi* biochemistry are facts to take advantage for the design of new drugs. In addition, due to risk that the parasite may be transmitted in tranfusions of contaminated blood banks, it is very important eliminate this parasite in blood to be transfused. At the present time, the drug use for blood sterilization is a stain discovered for this purposed many years ago: *Gentian Violet* [5] and suffers from limitations regarding to its safety [6]

We have previously reported the synthesis and antitrypanostatic activity of several isoprenoid derivatives [7,8] structurally related to the naturally occurring insect juvenile hormones [9] which had resulted to be mimics of these compounds in *in vitro* assays against Chagas' disease vector *Triatoma infestans* [10]. This interestings dual action has also been observed in non-isoprenoid drugs [11,12] structurally related to *Fenoxycarb*, a well known juvenile hormone analogue[13].

## RESULTS AND DISCUSSION

In an attempt to establish a chemical structure-biological activity relationship (SAR) several isoprenoid derivatives were designed, synthesized and evaluated as growth inhibitors of the epimastigote forms of *T. cruzi* cells. The new structures were designed taken into account the known biological activities of compounds **1-3** (Fig. 1). Compound **3** was employed as positive control. From the designed compounds, compounds **8, 11,** and **12** shown to be good anti replicative agents against this form of the parasite, while compounds **7, 15, 21** and **25** exhibited a moderate biological activity. The results are presented in the Table. The rest of the assayed drugs exhibited small to vanishing inhibitions values. In order to demonstrate the trypanostatic action of these drugs, parallel experiments of tritium labeled thymidine incorporation were carried out finding no cellular lysis and inhibition of incorporation values with percentages in agreement with the anti-replicative action shown in the table. It can be concluded that, taken as a reference compound **1**, [8] the lack of the terminal methyl group (C-10) replacing it by a hydrogen atom (compounds **15** and **17**) causes a dramatical impairing in biological activity in

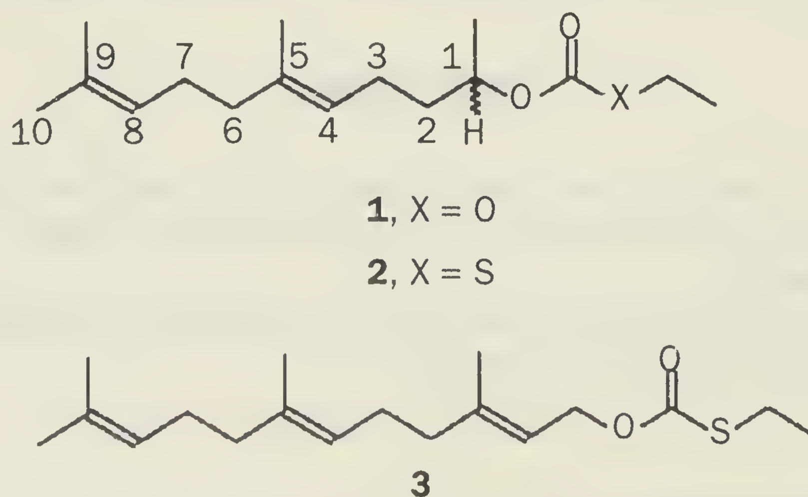
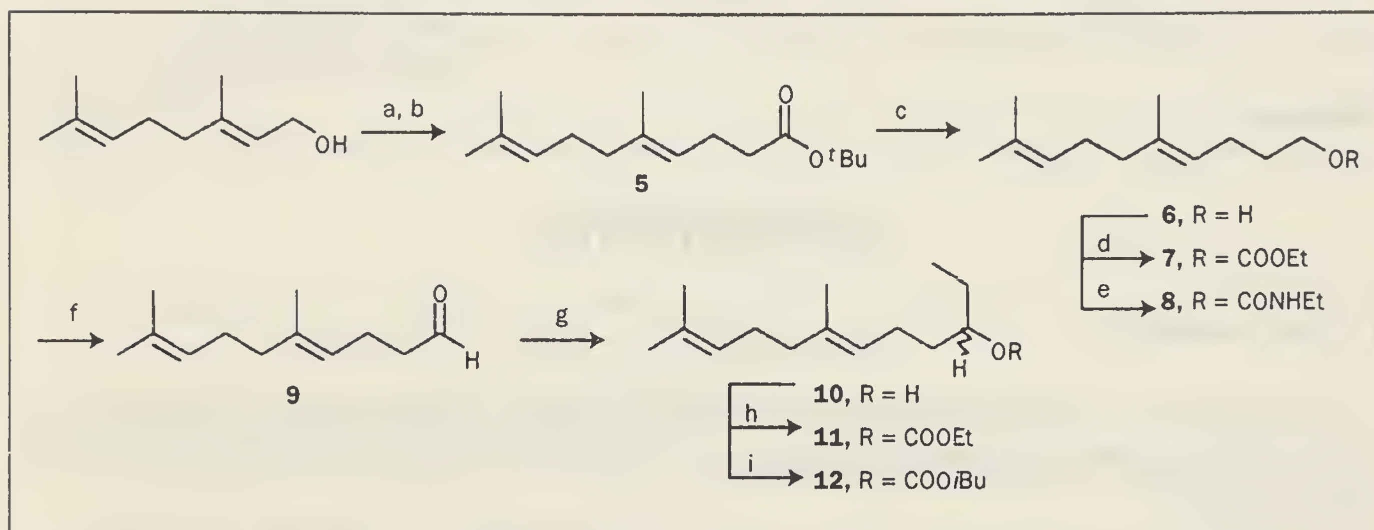
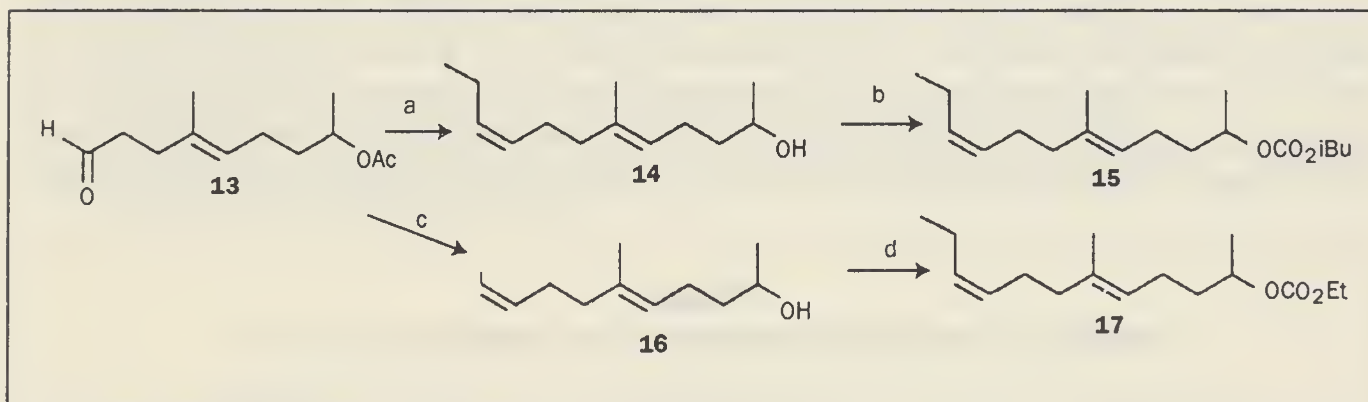



**Figure 1**

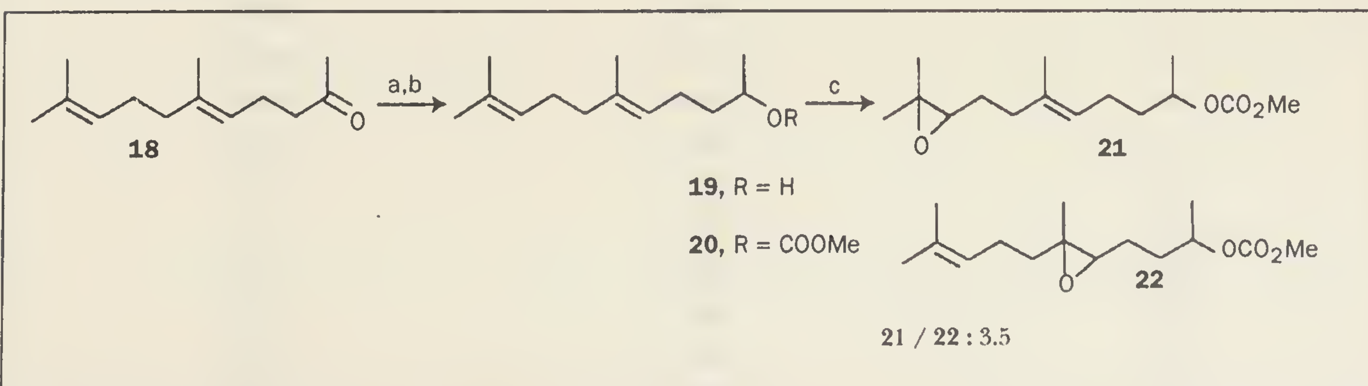
comparison with compound **1**. The replacement of the methyl group at C-1 in geranylacetyl derivatives (**1** and **2**) either by a hydrogen atom or an ethyl group has no substantially effect in modifying their anti replicative effect; rather they maintain a quite acceptable biological action (compounds **8, 11** and **12**). It is interesting to point out that the N-ethyl carbamate group is a promising moiety to be used at the polar end of these drugs because most of the assayed compounds having this functional group exhibited remarkable biological activity regardless of the




**Scheme 1: Reagents and conditions:** a) $PBr_3$, ether, -78°C, 100% yield; b) LDA, AcO$^t$BU, THF, HMPA, -78°C, 98% yield; c) $LiAlH_4$, THF, reflux. 95% yield; d) ClCOOEt / py, r.t., 79% yield; e) Ethyl isocyanate / py, 4-DMAP, r.t., 82% yield; f) DMSO, $(ClCO)_2$, $Cl_2CH_2$ (anh.) - 70°C, 92% yield; h) Cl-COOEt / py, r.t., 100% yield; i) ClCOOiBu / py, r.t., 83% yield.

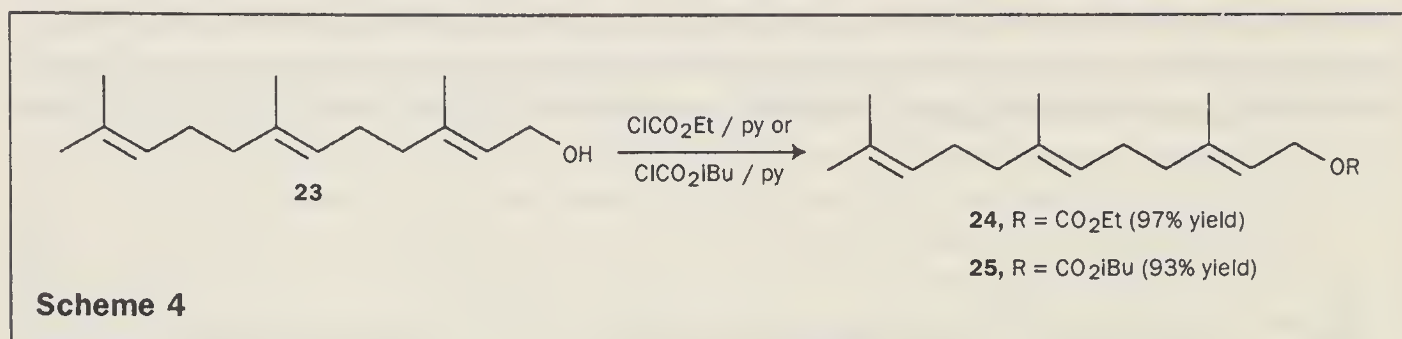



**Scheme 2: Reagents and conditions:** a) $(Ph_3PCH_2CH_2CH_3)^+ Br^-$, *n*-BuLi, THF, r.t., 71% yield; b) $ClCO_2iBu$ / py, r.t., 69% yield; c) $(Ph_3PCH_2CH_3)^+ Br^-$, *n*-BuLi, THF, r.t., 54% yield; d) $ClCO_2Et$ / py, r.t., 82% yield.




**Scheme 3: Reagents and conditions:** a) $NaBH_4$, EtOH, r.t., 100% yield; b) $ClCO_2Me$ / py, 65% yield; c) *m*-CPBA, $Cl_2CH_2$, 0ºC, 50% yield.

hydrocarbon skeleton[11]. Taking into account these and previous results, methyl and ethyl carbonates do not present good prospective to be employed in drug design for isoprenoid derivatives.



Scheme 4

## EXPERIMENTAL

### *Synthetic methods*

Compounds were prepared following known procedures. Starting materials, reagents, conditions and products are indicated in Schemes 1-4. All products gave correct spectroscopic and analytical data.

### *Biological Assays*

For the biological assays, *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, tulahuen strain, Tul-2 stock) were grown in a culture medium containing brain heart infusion (Difco) (33 g/l), tryptose (Difco) (3 g/l), disodium phosphate (4 g/l), potassium chloride (33 g/l) and glucose (0.3 g/l). The pH was 7.4 and after sterilization, penicillin (200 UI/ml), streptomycin (200 μg/ml), haemin (20 μg/ml) were added as a solution in 0.1 N sodium hydroxide, and then 10% (v/v) heat inactived (30 min. at 56°) fetal calf serum (GEN, SA) was also added. Stock cultures were perfor-

**TABLE**
**Influence of the active compounds on the replication of *T. cruzi***

| *Compound* | *Concentration (μmol/1)* | *Inhibition (%)* |
|---|---|---|
| 3 | 50 | 69.3 |
| 3 | 100 | 94.0 |
| 7 | 100 | 54.3 |
| 8 | 100 | 94.8 |
| 11 | 50 | 39.4 |
| 11 | 100 | 81.3 |
| 12 | 50 | 71.4 |
| 12 | 100 | 93.0 |
| 15 | 50 | 23.8 |
| 17 | 100 | 54.3 |
| 21 | 50 | 25.0 |
| 25 | 100 | 45.6 |

med at 25°C in 50 ml cylindrical tubes with screw caps containing in polystyrene disposable tubes (100 x 17 mm). The cultures were started with inocula from exponentially dividing cultures in the same medium. Samples were taken at different times (2, 4, 6 and 11 days) after inoculation of *T. cruzi* in the culture medium used. Cells were counted in a Neubauer chamber.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank UMYMFOR for spectra, Universidad de Buenos Aires and CONICET for partial financial support.

## REFERENCES

1. L. V. Kirchhoff, *New Engl. J. Med.* **1993**, 329, 639.
2. J. J. Marr and R. Docampo, *Rev. Infect. Dis.* **1986**, 8, 884.
3. A. Morello, *Comp. Biochem. Physiol.* **1988**, 90C, 1.
4. W. E. Gutteridge, *Br. Med. Bull,* **1985,** 41, 162.
5. V. Nussenzweig, R. Sonntag, A. Biancalana, J. L. Pedreira de Fleitas, V. Amato Neto and J. Kloetzel, *Hospital (Río de Janeiro)* **1953**, 44, 731.
6. J. B. Rodríguez and E. G. Gros, *Curr. Med. Chem.* **1995,** 2, 723.
7. J. B. Rodríguez, E. G. Gros and A. M. Stoka, *BioMed. Chem. Lett.* **1991,** 1, 679.
8. A. M. Stoka, C. Rivas, E. Segura, J. B. Rodríguez and E. G. Gros, *Z. Naturforsch.* **1990,** 45b, 96.
9. S. J. Kramer and J. H. Law, *Acc. Chem. Res.* **1980,** 13,1.
10. J. B. Rodríguez, E. G. Gros and A. M. Stoka, *Z. Naturforsch,* **1988,** 43b, 1038.
11. A. J. Schvartzapel, L. Fichera, M. Esteva, J. B. Rodríguez and E. G. Gros, *Helv. Chim. Acta* **1995,** 78, 1207.
12. J. B. Rodríguez, E. G. Gros and A. M. Stoka, *Z. Naturfosch.* **1989,** 44 b, 983.
13. P. Masner, S. Dorn, W. Vogel, M. Kaelin, O. Graf and E. Guenthart, *Pr. Nauk. Inst. Chem. Org. Fiz. Politech. Wroclaw* **1981**, 22, 809.

ANALES DE LA SOCIEDAD CIENTÍFICA ARGENTINA, VOLUMEN 227 - NÚMERO ESPECIAL, 1997 (93 - 116)

# ESTUDIOS TEORICOS DE LAS CICLODEXTRINAS Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSION

*Eduardo A. Castro*

CEQUINOR, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, C.C. 992, (1900) La Plata, Argentina.

*Dora J. Barbiric*

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, (1428) Núñez, Buenos Aires, Argentina.

## RESUMEN

Se ofrece una revisión de los métodos de la química teórica que se emplean en el estudio de las ciclodextrinas y sus complejos de inclusión. A fin de comprender mejor los alcances y las limitaciones del modelado molecular, se describen las principales propiedades fisicoquímicas de estos sistemas.

## ABSTRACT

We present a review of the theoretical chemistry methods currently used to study cyclodextrins and their inclusion complexes. In order to better understand the scope and the limitations of the molecular modeling we describe the main physicochemical properties of these systems.

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

# 1. INTRODUCCION

La química supramolecular es un campo de la ciencia de carácter marcadamente interdisciplinario que abarca los aspectos químicos, físicos, biológicos, farmacéuticos y tecnológicos de especies químicas de gran complejidad, las cuales se encuentran unidas y organizadas por medio de interacciones intermoleculares no covalentes. Esta área relativamente nueva se ha ido definiendo, conceptualizando y estructurando rápidamente en un sistema bastante coherente.

Sus raíces se han extendido a la química orgánica y los métodos sintéticos para la construcción de receptores, a la química de coordinación y los complejos de ligandos con iones metálicos, a la fisicoquímica y los estudios experimentales y teóricos de las interacciones intermoleculares y a la bioquímica y los procesos biológicos, donde todo comienza con la unión de un substrato y el reconocimiento consecuente. Una característica esencial de la química supramolecular es el rango de perspectivas que para el estudio de un dado fenómeno ofrecen las distintas especialidades en tanto se adopte una actitud multidisciplinaria no sólo en el quehacer concreto sino (y muy especialmente) en el modo de encarar y desarrollar la investigación así como de analizar, interpretar y correlacionar los resultados. Naturalmente, tal amplitud conceptual y metodológica no es de fácil materialización y representa un verdadero desafío y un estímulo significativo para la imaginación creadora del químico [1].

Los complejos de las ciclodextrinas (CDs) con diversos tipos de moléculas para formar compuestos del tipo anfitrión (o receptor) - invitado (o huésped) (host-guest complexes) conforman una de las varias clases de compuestos pertenecientes al campo de la química supramolecular [2-9]. La degradación enzimática del almidón produce una mezcla de glucosa, maltosa, maltotriosa, etc., o sea una larga serie de cadenas lineales o ramificadas de malto-oligómeros conocidos con la denominación de **dextrinas.** Este tipo de degradación es un verdadero proceso hidrolítico ya que el producto primario de la separación del enlace glucosídico reacciona con una molécula de agua. Si en cambio el almidón se degrada por la acción de la enzima glucosiltransferasa, el producto primario de la ruptura de la cadena toma parte de una reacción intramolecular sin la participación de una molécula de agua. En ese caso se forman productos cíclicos mediante uniones α-1,4, los cuales se conocen con el nombre de **ciclodextrinas.** Las CDs son una familia de tres oligosacáridos cíclicos más otros de menor interés que se producen en una proporción más baja. Las tres CDs más importantes son la α-CD, la β-CD y la γ-CD, las cuales están compuestas por 6, 7 y 8 unidades, respectivamente de D-(+)-glucopiranosas unidas en forma α-1,4, tal como lo muestra la figura 1.

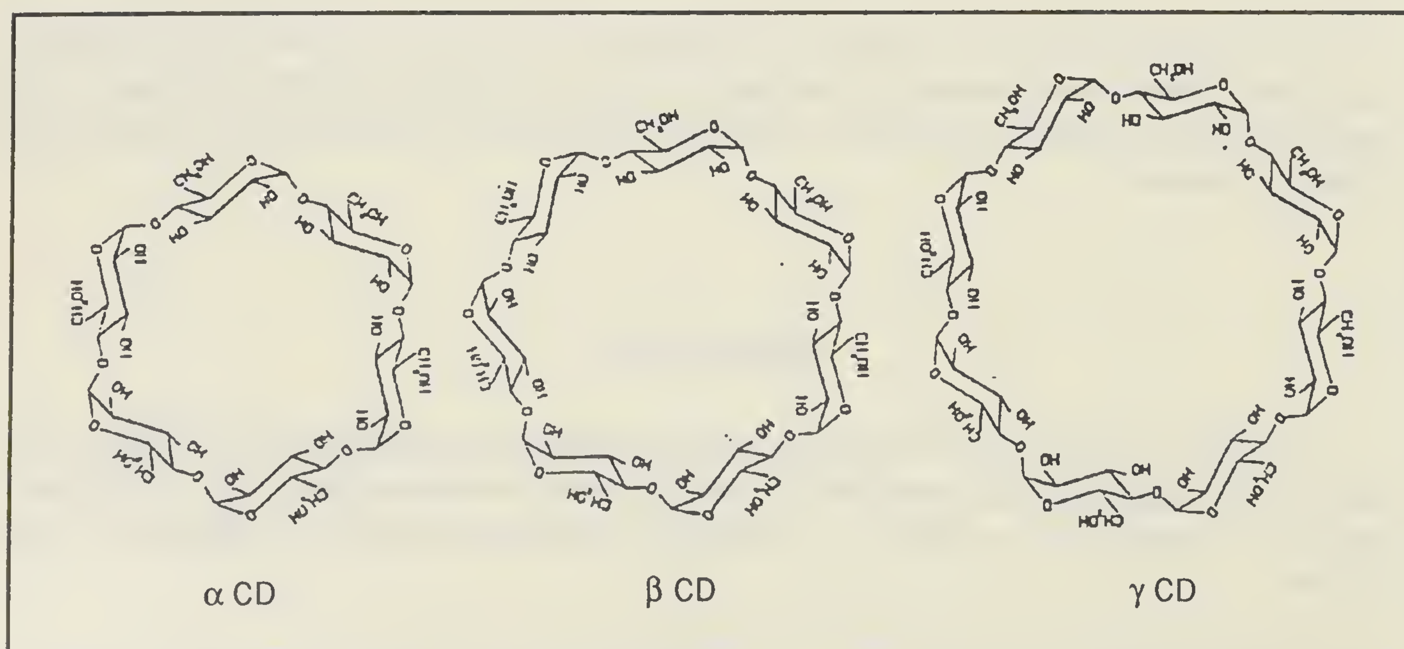



**Figura 1:** Estructura de las a, B y g ciclodextrinas.

Sundararajan y Rao demostraron por cálculos de mapas de energía conformacional que no se pueden formar CDs con menos de 6 anillos debido a razones estéricas [10]. Por otra parte, se ha informado acerca de la existencia de homólogos superiores, i.e. δ-, ε-, ξ-, y η-CDs que contienen 9, 10, 11 y 12 anillos, respectivamente, de unidades glucosídicas [11,12], aunque todavía estos compuestos supracíclicos no han podido ser caracterizados en forma totalmente satisfactoria.

Las CDs poseen una notable capacidad para formar complejos de inclusión con una gran cantidad y variedad de especies moleculares [13-20]. Debido a esta característica, han encontrado una amplia aplicación en diversos campos tales como la tecnología química [13, 21, 22], el desarrollo sintético de enzimas artificiales [23], el reconocimiento molecular y la química supramolecular [24], la cromatografía [25-30], los fármacos [31-42], los alimentos y cosméticos [43-51], los pesticidas [52-57], la espectroscopía [58-63], y la química medicinal [64-71]. El elevado número de complejos de inclusión de las CDs que se forman en muy distintas condiciones, así como la complejidad molecular de las especies involucradas parecen indicar que son varios los factores que determinan las fuerzas de enlace y la estabilidad de los compuestos. En consecuencia, es necesario recurrir tanto a medios experimentales como a métodos teóricos para realizar un estudio acabado de estos complejos.

El propósito de este artículo es reseñar el conjunto de procedimientos teóricos que se han venido utilizando para obtener información acerca de las uniones químicas determinantes de la estabilidad de los complejos de inclusión de las CDs. Sin embargo, debido a la multiplicidad de factores que afectan a las uniones receptor-huésped, primero será necesario analizarlos con algún detalle para que el lector tenga una noción más precisa del uso de los métodos computacionales. Una mera enunciación descriptiva de las posibilidades de estudios teóricos sin entrar a considerar, aunque sea someramente, las propiedades fisicoquímicas de los complejos, podría inducir a serios errores conceptuales y/o perspectivas parcializadas acerca de la naturaleza de las uniones químicas en estos compuestos.

Debido a la extensión de este campo de la química, esta revisión no es abarcativa ni totalizadora, sino que sólo intenta ofrecer una visión actualizada de algunos aportes significativos de la química teórica al emplearla en el estudio de las CDs y sus complejos de inclusión.

## 2. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LAS CDs Y SUS COMPLEJOS DE INCLUSION

Debido a la conformación C1 de las unidades glucopiranósicas, todos los grupos hidroxilos secundarios están situados en uno de los bordes del anillo (el de mayor diámetro) y todos los hidroxilos primarios en el otro (i.e. en el de menor diámetro). La cavidad interior se encuentra revestida por los átomos de hidrógeno y los puentes de oxígeno glucosídico, respectivamente. Los pares de electrones no-enlazantes de estos puentes se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad, generando una alta densidad electrónica. Entre las propiedades fisicoquímicas más destacables de esta cavidad cabe mencionar su carácter hidrofóbico [72], y la existencia de un momento dipolar marcado [73]. El grupo $C_2$-OH de una unidad glucopiranósica puede formar un puente de hidrógeno con el grupo $C_3$-OH de la unidad adyacente [74]. En la β-CD se forma un cinturón secundario completo por estas uniones hidrógeno, otorgándole cierta rigidez a la estructura y al mismo tiempo haciéndola la menos soluble de todas las CDs. En la molécula de α-CD este cinturón es incompleto ya que una unidad glucopiranósica está ubicada en una posición distorsionada [75, 76] y por ello solamente se forman cuatro de los seis puentes de hidrógeno posibles. La γ-CD no es coplanar, posee una estructura más flexible y en consecuencia es la más soluble de las tres CDs. Los valores experimentales de las constantes de equilibrio para

el intercambio hidrógeno-deuterio en la hidrólisis secundaria indican que el sistema más fuerte de uniones por puentes de hidrógeno es el de la β-CD [77].

Si bien inicialmente se podría considerar que las CDs tienen una forma cilíndrica, la rotación libre de los grupos hidroxílicos primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad del lado donde están ubicados y como resultado de ello es más adecuado asignar una geometría cónica. Las dimensiones aproximadas de las CDs se muestran esquemáticamente en la Figura 2.

La conformación de las CDs en solución es casi idéntica a la existente en el estado cristalino. Las cavidades de las CDs cristalizadas a partir de soluciones acuosas no están vacías sino llenas de moléculas de $H_2O$ (entre 2 y 8 moléculas) y a su vez otras moléculas de agua son parte integral de la estructura del cristal. Los complejos de inclusión de las CDs se forman por substitución (total o parcial) del agua incluida por la molécula huésped apropiada. Al eliminarse las moléculas de agua de las CDs se produce una marcada modificación de los respectivos espectros de NMR y de difracción neutrónica y de rayos X, lo cual se debe al cambio del grado de distorsión en los macroanillos [78]. Tampoco en solución se puede considerar que la cavidad de las CDs esté vacía.

Las CDs no poseen grupos terminales reducibles, y por ello dan un producto coloreado al reaccionar con antrona. Asimismo, no se forman ni ácido fórmico ni formaldehído en la reacción con periodato, evidenciando de esta manera que las moléculas no contienen grupos libres terminales [79].

Los derivados de las CDs se pueden obtener mediante las siguientes modificaciones:

a) substitución de uno o más átomos de H de los hidroxilos primarios y/o secundarios (ésteres, éteres, glucosil-CDs);
b) substitución de uno o más hidroxilos primarios o secundarios (desoxi-, halógeno-, amino-, etc.);
c) eliminación de los átomos de H del grupo $C_5$-$CH_2OH$ ($C_5$-COOH); y
d) rotura de uno o más enlaces $C_2$-$C_3$ por oxidación con periodato (CD-dialdehído o, luego de la reducción, éteres macro-coronas).

La figura 3 ilustra esquemáticamente las variedades estructurales de los derivados de las CDs.

Es muy extensa la lista de los diversos tipos de derivados de las CDs y existen excelentes publicaciones de revisión que tratan este tema [3, 5, 80-83].

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares que poseen la estructura caracte-

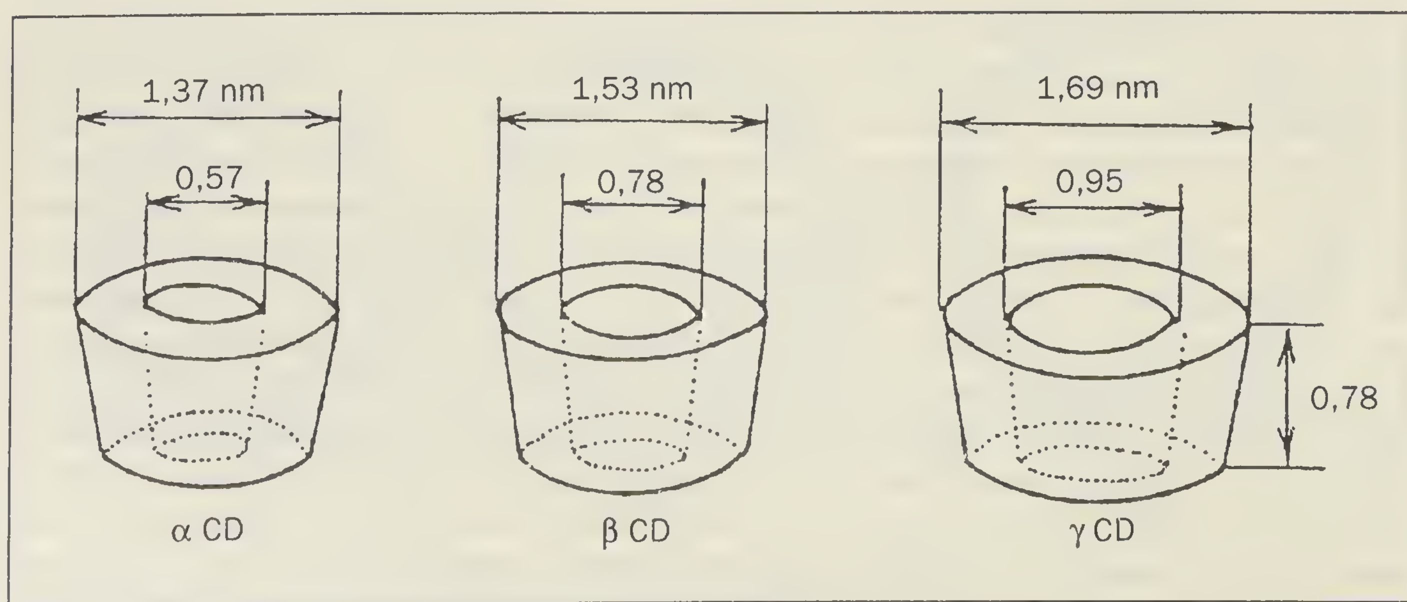



**Figura 2:** Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas.

rística de un aducto, en el cual un compuesto (molécula anfitriona o receptora) encierra espacialmente y contiene de un modo total o parcial a otra (huésped o invitada). El compuesto encerrado se sitúa en una cavidad que provee el anfitrión y modifica en grado variable la estructura de éste. O sea que las medidas y la forma de la cavidad disponible sufren distintos tipos y grados de deformaciones, según sea la naturaleza de la molécula incluida.

Los complejos de inclusión de las CDs se forman cuando se satisfacen varios requerimientos en la relación receptor-huésped. Uno de ellos es que los sitios de unión de ambas moléculas deben ser estereoelectrónicamente complementarios. La propiedad característica de la molécula anfitriona es que sus sitios de unión están orientados en la misma dirección espacial mientras que los de la molécula huésped lo están de un modo divergente en el complejo. Entonces, la asociación de estos lugares de unión convergentes y divergentes determina la base esencial para la formación de los complejos de inclusión donde se establecen uniones químicas no covalentes entre el receptor y el invitado. En la Figura 4 se representa esquemáticamente la formación de estos complejos de inclusión de las CDs.

Naturalmente, las CDs forman complejos con aquellos compuestos que además de satisfacer los requerimientos de complementariedad estereoelectrónica, posean dimensiones compatibles con las de las respectivas cavidades [84] y por ende los factores geométricos son decisivos al momento de determinar qué moléculas invitadas pueden penetrar dentro de las cavidades de las CDs.

Las estructuras de los complejos de inclusión de las CDs son significativamente distintas en estado cristalino y en solución. En este último caso la molécula huésped reside en la cavidad que al mismo tiempo puede albergar a un par de moléculas del solvente y todo el complejo está rodeado por una capa de solvatación de moléculas de agua. En el estado cristalino se da una situación distinta ya que no sólo se acomodan moléculas huéspedes en la cavidad accesible sino también en las cavidades intermoleculares formadas por el retículo cristalino o entre dos moléculas de complejo en una disposición tipo "emparedado". Inclusive, algunas de las moléculas

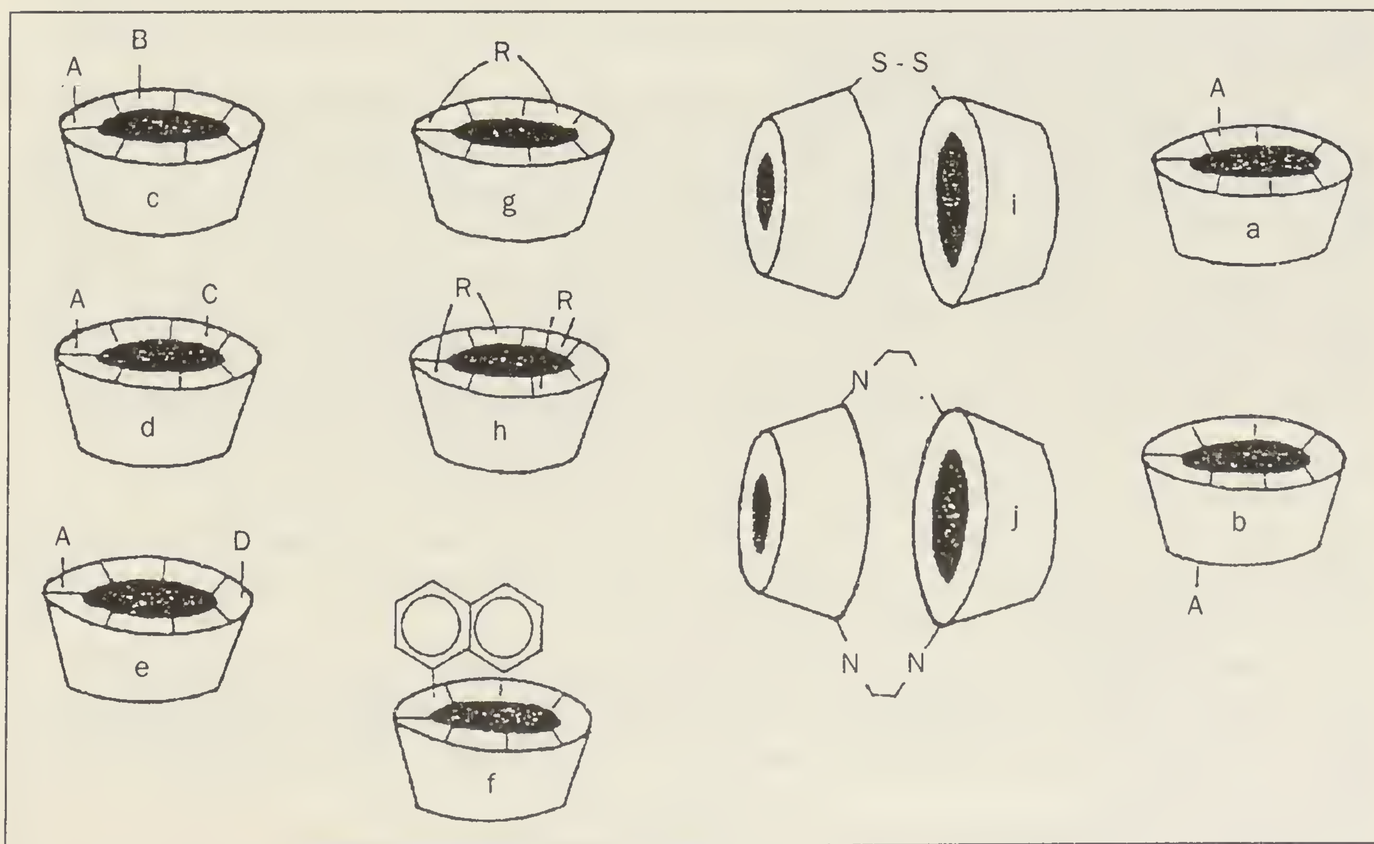



**Figura 3:** Estructuras de los derivados de las ciclodextrinas: **a:** monosubstituido sobre el lado de los hidroxilos secundarios; **b:** monosubstituido sobre el lado de los hidroxilos primarios; **c:** disubstituidos A-B; **d:** disubstituido A-C; **e:** disubstituido A-D; **f:** anexado; **g:** coronado; **h:** doblemente coronado; **i:** doble con un solo puente; **j:** doble con dos puentes.

de las CDs permanecen sin ocupar o incluyen solamente agua. Como consecuencia de estas características los complejos cristalinos raramente tienen una composición estequiométrica, mientras que en solución las relaciones molares son usualmente entre números naturales y el caso típico es 1:1.

Las moléculas incluidas se orientan normalmente dentro del receptor de modo tal de posicionarse favorablemente para alcanzar un contacto máximo con la parte hidrofóbica del anfitrión. La parte hidrofílica de la molécula huésped permanece en la zona exterior del complejo tanto como le sea posible. De esta manera, la molécula huésped se asegura un máximo contacto con el solvente y los grupos hidroxilos del anfitrión.

Es posible la formación de complejos con moléculas cuyas dimensiones exceden con holgura las de las cavidades de las CDs. Esto sucede cuando solamente penetran en la cavidad del carbohidrato ciertos grupos o cadenas laterales del huésped los que a su vez, deben hallarse en una disposición espacial libre de obstrucción o impedimento estérico por parte de otros grupos voluminosos.

Los requerimientos estéricos para la complejación se pueden estimar cualitativamente mediante el empleo de los modelos moleculares de Stuart. Cuando el huésped es muy grande (por ejemplo, muy largo), se pueden formar complejos del tipo 2:1 y de otras relaciones estequiométricas.

De acuerdo con ciertas consideraciones teóricas [85] y varias observaciones experimentales, los complejos de las CDs en estado puro están caracterizados por relaciones anfitrión:huésped bien definidas y estrictamente constantes. Sin embargo, en la realidad de los hechos varios factores tienden a variar la composición ideal del complejo. Así, en solución, el equilibrio asociación/disociación determina la relación complejado/sin complejar para el huésped y el receptor. A su vez, la dependencia de las dimensiones y de la forma del anfitrión hace que puedan coexistir en solución complejos de relación estequiométrica 1:2, 2:1 o 2:2, además de la habitual 1:1. Al mismo tiempo, esto dependerá de la concentración de CD y/o de la del huésped. Sin embargo, se puede considerar que en soluciones acuosas y en condiciones no extremas de concentración, la relación 1:1 es la predominante.

El grado o extensión de la formación de complejos de las CDs dependen también de la polaridad de la molécula huésped. Las moléculas con un marcado carácter hidrofílico (i.e. muy solubles en agua), fuertemente hidratadas y los grupos ionizables no son complejables o pueden llegar a serlo en forma muy débil. Solamente las moléculas que son menos polares que el agua pueden formar complejos con las CDs. La estabilidad de un complejo es proporcional al carácter hidrofóbico de los substituyentes y así, por ejemplo, un grupo metilo o etilo ubicado en una posición adecuada habrá de aumentar dicha estabilidad un grupo metilo en una posición orto respecto de un grupo carbonilo ejerce un efecto de apantallamiento sobre la propiedad de hidrofilicidad de éste y, en consecuencia, aumenta el carácter hidrofóbico de la molécula.

En principio es imprescindible la presencia de un solvente para formar complejos. Sin embargo, esta formación se acelera en solución. En términos generales, las substancias que poseen un buen grado de solubilidad son débilmente complejadas y los huéspedes con baja solubilidad en agua son complejables en muy buen grado.

A los fines preparativos, a veces hace falta disolver el huésped en algún solvente orgánico para formar el complejo en disolución acuosa. En tales casos, se pueden formar algunos complejos del solvente con la CD, ya sean los del tipo solvente-CD o como complejos ternarios huésped-solvente-CD.

El término "estabilidad del complejo" se refiere al equilibrio en solución



**huésped + CD ⟷ huésped - CD**

No existe una correlación directa entre la estabilidad del complejo en solución y su grado

de solubilidad. Por otra parte, los complejos con una baja estabilidad pueden resultar fácilmente cristalizables de su solución y los complejos muy estables pueden llegar a ser muy difíciles de aislar. Lo opuesto también se cumple. Cuando se detecta la existencia en solución acuosa de un complejo de CD bien definido, ello no significa necesariamente que el producto sólido aislado, sea por cristalización o deshidratación por congelamiento, también sea un verdadero complejo de inclusión. Todas estas peculiaridades hacen que no existan métodos preparativos universales y que el procedimiento a seguir deba ajustarse en cada caso a las características de la molécula huésped.

La inclusión de un huésped en la cavidad de la CD en solución es esencialmente un proceso de substitución de las moléculas de agua incluidas en la cavidad por la del huésped menos polar (ver Figura 4). Este proceso es una interacción energéticamente favorecida de la molécula incluida, relativamente no polar, con la cavidad hidrofóbica parcialmente solvatada, en la cual tanto los cambios entrópicos como los entálpicos juegan un papel relevante.

Si bien se han realizado muchos estudios vinculados a la determinación de la naturaleza de las fuerzas que originan el proceso de complejamiento, esta cuestión todavía no se encuentra totalmente resuelta [72, 73, 76, 86-100]. En lo que sí hay acuerdo es que son varias y bastante diversas las contribuciones posibles a la unión química entre el huésped y la CD, siendo las más importantes las que se enuncian a continuación:

- interacciones del tipo van der Waals
- uniones por puentes de hidrógeno
- interacciones dipolo-dipolo
- impulsión hidrofóbica
- liberación de agua de mayor energía desde la cavidad
- desprendimiento de energía de tensión del anillo macrocíclico
- efectos de tensión solvente-superficie

Como puede apreciarse, son variadas las fuerzas que eventualmente se deben considerar en cada paso. El papel de la substitución del agua por un huésped de dimensiones, forma y polaridad apropiados parece ser universal. Las CDs se pueden considerar como hidrofóbicas en el sentido de que su solubilidad aumenta levemente cuando se agrega al agua una pequeña cantidad de un solvente apolar. Esto demuestra que la cavidad de la CD es hidrofóbica en relación al agua [101]. La solvatación de esta región hidrofóbica está lejos de ser ideal.

Las moléculas de agua localizadas en la cavidad de la CD no pueden satisfacer su capacidad de formar uniones hidrógeno tetraédricas, tal como sucede en el seno del solvente. Entonces, se las puede considerar como moléculas de energía o entalpía acrecentada. Se logra una dis-

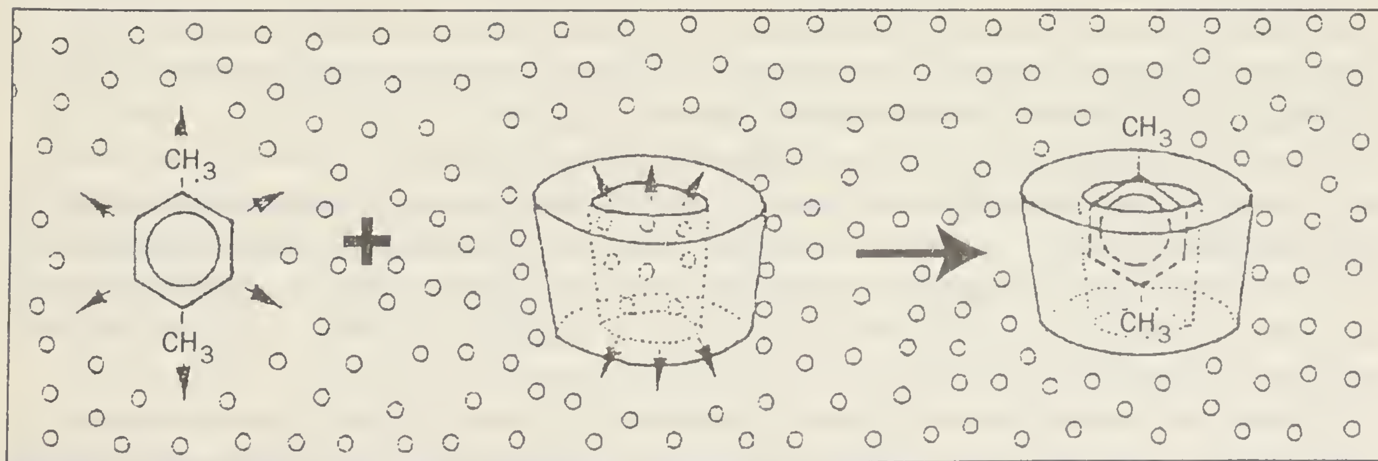



**Figura 4:** Representación esquemática del complejo de inclusión de la ciclodextrina. El p-xileno es la molécula huésped y los círculos pequeños representan a las moléculas del solvente.

minución de energía del sistema por el aumento de la interacción solvente-solvente ya que la contactación superficial entre el solvente y el huésped así como entre el solvente y la cavidad se reduce con el ingreso del huésped en esta última [102]. La liberación de la energía de tensión del macrociclo, o sea la transición del anillo de CD del estado tensionado a otro más relajado por la penetración del huésped parece ser cuantitativamente significativa sólo en el caso de la α-CD. Las β-y γ-CDs "vacías" no se encuentran tensionadas.

La formación del complejo de inclusión de la CD comprende las siguientes etapas elementales [84, 89, 102, 103]:

A. Las moléculas de agua salen de la cavidad de la CD y pasan a un nivel energético correspondiente al estado gaseoso. Como consecuencia de ello, disminuye el número de uniones hidrógeno y de interacciones de van der Waals, mientras que aumentan los grados de libertad rotacional de las moléculas de agua.
B. Disminuye la energía conformacional del anillo de la CD por relajación, especialmente para la α-CD.
C. La molécula huésped apolar se desprende de su capa de solvatación y también asume el estado de un gas ideal. La capa hidratada vacía colapsa y se reordena.
D. La molécula huésped, considerada en el estado de gas ideal, se introduce en la cavidad vacía de la CD y el complejo se estabiliza estableciendo interacciones del tipo van der Waals y eventualmente uniones por puentes de hidrógeno. La molécula huésped retiene un grado de libertad rotacional.
E. Las moléculas de agua desplazadas se condensan (pasan del estado gaseoso al estado líquido). Los cambios de entalpía y entropía se consideran iguales a los de la substancia pura.
F. Se restablece la estructura del agua alrededor de la parte expuesta de la molécula huésped y se integra con la capa de hidratación del anillo de la CD.

Si bien los aportes individuales de cada tipo posible entre la CD y el huésped son pequeños, el establecimiento de un número grande de uniones débiles permite alcanzar una estabilidad al complejo que es análoga a la suministrada por una unión de tipo covalente. Naturalmente, la contribución de cada clase de unión dependerá del tipo de CD y del huésped particular.

Merece especial atención la interacción hidrofóbica o solvofóbica. El agua juega un papel esencial en la formación del complejo ya que la hidratación de éste se encuentra energéticamente favorecida cuando se la compara con la hidratación de cada componente por separado. Este fenómeno se denomina **"interacción hidrofóbica"** y no se debe a la atracción mutua de dos componentes, sino que es debida a la cohesión intrínseca del agua.

El papel de la unión hidrógeno no es universal pues también se forman complejos estables con huéspedes tales como el benceno que no puede establecer este tipo de enlace químico. Por otra parte, la inclusión restringe moderadamente la rotación libre alrededor del eje de simetría de la molécula incluida. Esta restricción en la rotación es uno de los componentes del término entrópico inusual asociado a la interacción huésped-CD [86].

El análisis termodinámico de los complejos de inclusión muestra que $\Delta H$ es siempre negativa, o sea que el complejo tiende a disociarse cuando aumenta la temperatura, mientras que los valores de $\Delta S$ pueden ser negativos o positivos. Esto nuevamente indica que, dependiendo de la molécula huésped, son varias las fuerzas involucradas en la formación del complejo [4]. Cuando se grafica $\Delta H$ vs $\Delta S$ para diversos huéspedes y las tres CDs, se obtienen una relación lineal con pendiente negativa.

Uno de los factores que contribuyen al cambio entrópico es el agua. A partir de una situación inicial de rodear a la molécula huésped apolar de una manera ordenada, el agua finaliza en un estado desordenado. Al mismo tiempo, hay una pérdida de los grados de libertad translacionales y rotacionales debido a la asociación de las dos moléculas. Estos dos factores opuestos

son de magnitud semejante, de modo que el cambio neto de entropía es muy pequeño o nulo.

El cambio entálpico también se debe a varios factores. La pérdida de las moléculas de agua altamente ordenadas en derredor del substrato orgánico es desfavorable ya que esto puede originar un decrecimiento en el número de uniones hidrógeno en el sistema. Esto es compensado casi totalmente por el cambio entálpico favorable debido a la separación de las moléculas de agua en la molécula huésped. Las moléculas de agua con energía alta separadas de la cavidad de la CD se integran al seno del solvente con el consiguiente aumento de uniones solvente-solvente [104].

La alta densidad electrónica prevaleciente dentro de la cavidad de la CD moviliza a los electrones de la molécula incorporada. Como consecuencia de ello resultan cambios característicos en varias propiedades espectrales tanto en el huésped como en el anfitrión [105]. De especial importancia es la espectropía de NMR, ya que en base a ella se puede determinar qué átomos del huésped se encuentran localizados dentro de la cavidad de la CD y además cómo se encuentran orientados. Como el huésped no se encuentra inmovilizado dentro de la CD, su movilidad en la cavidad se puede monitorear determinando la relajación del $^{1}H$ y del $^{13}C$.

Algunos resultados experimentales parecen indicar que los complejos de los compuestos aromáticos con $\alpha$-CD son sistemas débilmente acoplados en el aspecto dinámico o sea que las moléculas del huésped y el anfitrión pueden realizar movimientos moleculares diferenciados. Esto se puede explicar en base al hecho de que las fuerzas responsables de la interacción de las dos especies poseen poca especificidad direccional.

Un complejo ternario es aquél con dos huéspedes distintos, ninguno de los cuales es agua, que se incorpora a la misma cavidad de la CD. En algunos casos se registra al hecho de que moléculas que no poseen la capacidad de formar complejos binarios pueden incorporarse a la cavidad acompañando a otra molécula [106]. Por ejemplo, el éter dietílico no forma complejo con la CD pero puede obtenerse uno del tipo ternario con el antraceno. Los complejos ternarios siempre son más estables que los dos complejos binarios correspondientes.

Finalmente, vale la pena señalar los métodos fisicoquímicos que se utilizan en el estudio experimental de las CDs y sus complejos de inclusión: cristalografía de rayos X [107], espectroscopía NMR [108], espectroscopía ESR [109], métodos electroquímicos [110, 111], medidas cinéticas y termodinámicas [89, 97, 112-114], termogravimetría, calorimetría de barrido diferencial, espectroscopías IR y UV, espectrometría de fluorescencia, dicroísmo circular, difracción de rayos X y de neutrones, resonancia paramagnética electrónica (EPR), doble resonancia electrónica (ENDOR) y espectroscopía Raman. Los resultados experimentales provenientes del empleo de todas estas técnicas forman un rico y variado substrato para complementar los hallazgos provenientes de los estudios teóricos.

## 3. METODOS TEORICOS

Para alcanzar un grado adecuado de comprensión acerca de la capacidad que poseen las CDs para unirse a una o más moléculas huéspedes, es necesario conocer detalladamente a nivel molecular el origen e interrelación de las fuerzas que operan en estos complejos de inclusión así como las respectivas geometrías relativas de los grupos funcionales reactivos que se aproximan en el acto de unión. Si bien puede obtenerse una buena cantidad de información valiosa a partir de las medidas experimentales, éstas no son suficientes como para acceder a una visión completa y abarcativa de todos los aspectos atinentes al fenómeno del enlace químico.

De tal forma, el modelado molecular (i.e. el uso de computadoras para predecir y evaluar las estructuras y las propiedades de las moléculas) suministra un medio poderoso y versátil a la vez, que se suma al arsenal de métodos experimentales señalados en la sección anterior para el estudio de las CDs y sus complejos de inclusión. Si bien el número de trabajos publicados en la literatura corriente que se refieren al estudio teórico de las CDs y sus derivados no es muy

grande, su cantidad se está incrementando significativamente [115, 116]. Básicamente son tres los tipos de métodos teóricos empleados en este terreno: a) la mecánica molecular, b) la dinámica molecular y c) las técnicas semiempíricas basadas en la teoría de los orbitales moleculares. Debido a la magnitud molecular de las especies involucradas. de momento no pueden realizarse cálculos del tipo ab-initio, aunque es dable esperar que en un futuro no muy lejano se pueda llegar a concretar tal posibilidad.

A pesar de las diferencias fundamentales que existen entre las distintas clases de métodos teóricos señalados, todos los estudios se centran en buscar respuestas válidas a las siguientes preguntas:

a) Cuáles son las fuerzas que gobiernan el fenómeno de complejación?
b) Cuáles son las geometrías relativas del huésped y el anfitrión en el complejo?
c) Qué clase de correlación existe entre la geometría y la energética de las uniones químicas con los patrones de reactividad observados experimentalmente?

El propósito de esta sección es el de destacar en forma sumaria algunos de los aportes significativos en esta área de investigación, discutiendo la aplicación de las tres clases de métodos teóricos a las CDs y sus interacciones con las moléculas incluidas. El énfasis conceptual se pondrá en el empleo práctico de la teoría para resolver algunos problemas importantes respecto de las propiedades estructurales y dinámicas de las CDs, sus complejos de inclusión y la relación existente entre la información derivada de los modelos matemáticos y los resultados experimentales.

Como los métodos teóricos son bien conocidos y la mayor parte de los programas de cálculo son de asequibilidad irrestricta y están muy bien documentados, no ofrecemos descripción alguna de ellos y el lector interesado puede consultar la literatura específica correspondiente [117-131] para las ecuaciones generales así como los detalles de implementación computacional del software pertinente.

## *A. Mecánica Molecular*

La mecánica molecular (MM) es un método en el cual las estructuras y las energías relativas de las moléculas pueden ser calculadas empíricamente empleando expresiones clásicas sencillas para las interacciones atómicas [118]. La energía del sistema molecular se expresa como una suma de contribuciones tales como estiramientos de uniones, rotaciones torsionales, deformaciones angulares, interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas. Esta clase de aproximación hace que la energía estérica resultante de un cálculo por MM no se puede asociar a la energía absoluta de la molécula sino más bien debe considerarse como la energía relativa a una molécula idealizada, sin tensiones y compuesta por los mismos átomos que aquélla. El sistema de ecuaciones que describe la energía molecular en función de la estructura junto con los parámetros derivados empíricamente para describir las interacciones individuales, se denomina **"campo de fuerzas"**.

La simplicidad newtoniana de la MM permite una muy fácil y rápida computación de las propiedades geométricas, energéticas y otras estrechamente vinculadas a éstas para estudiar clases muy variadas de sistemas que abarcan desde moléculas orgánicas sencillas hasta las complejas interacciones de las enzimas con sus moléculas substrato [132, 133]. Para el caso que aquí nos ocupa, o sea las CDs y sus complejos de inclusión, podemos considerar que la situación corresponde a una ubicación intermedia en esta escala de complejidad. Es necesario destacar que al apelar al uso de este tipo de metodología se deben guardar ciertas precauciones básicas que hacen a un empleo correcto y racional de la MM, ya que su sencillez ha inducido a varios abusos con la consecuente proliferación de resultados y conclusiones incorrectas [134].

Naturalmente, si el objetivo es estudiar los complejos de inclusión de las CDs, primero es necesario considerar las estructuras de las CDs aisladas [135-138]. Las estructuras resultantes de estos primeros estudios teóricos muestran un alto grado de simetría y los valores obtenidos se encuentran en muy buen acuerdo con los datos provenientes de los experimentos de rayos X. Sin embargo, en una publicación posterior, Lipkowitz destacó algunos errores en el empleo de tales estructuras [139], ya que la consideración que ha hecho la literatura estándar acerca de ellas como moléculas simétricas con forma de cono truncado en verdad es una sobresimplificación. En efecto, mediante el uso de los dos campos de fuerzas contenidos en los programas AMBER [124] y MM2 [118] respectivamente, incluidos a su vez los dos en el paquete MACROMODEL [125], este autor constató la existencia de mínimos para conformaciones de simetría menor a $C_n$ (n = 6,7 y 8 para la α-, β- y γ-CD, respectivamente). En consecuencia, se concluye que las CDs son conformacionalmente complejas y que aquellas estructuras simétricas descriptas en la literatura corriente deben considerarse como una suerte de estructuras temporalmente promediadas y que estos sistemas anulares son mucho más flexibles que lo supuesto. El trabajo de Lipkowitz constituye un aporte de especial significación ya que permite derivar algunas advertencias importantes en este campo de estudio:

a) los resultados dependen del método computacional usado.
b) la conformación que se obtiene en general sólo es uno de los muchos mínimos locales existentes, puesto que no es posible realizar una minimización exhaustiva.
c) las CDs y sus complejos de inclusión son entidades térmicamente móviles, que realizan movimientos de vibración y rotación, además de trasladarse como un todo a través del espacio ordinario.
d) el fenómeno de solvatación puede alterar radicalmente tanto a la geometría como a las estabilidades relativas de varias conformaciones.

Todo esto no debe constituir una apreciación negativa acerca del uso de los métodos de la MM ya que a pesar de las diversas aproximaciones y la existencia de errores, el uso adecuado y juicioso de estos procedimientos provee una información rápida y razonablemente precisa acerca de la estructura molecular de las CDs y sus complejos de inclusión.

En un estudio destinado a investigar las propiedades de convergencia y los resultados provenientes de distintos procedimientos de minimización así como el testeo de sus respectivos grados de eficiencia en el modelado estructural de la solvatación de la β-CD, Linert y col. [140] concluyeron que en oposición a los resultados obtenidos para la inclusión de las moléculas de mayor dimensión, las moléculas de agua se localizan en la periferia del sistema anular. Estos posicionamientos de deben a la formación de uniones por puentes de hidrógeno entre el agua y los grupos $OH^-$ 6 periféricos. La energía de interacción entre la CD y una molécula de agua es alrededor de 50 kJ/mol y parece mantenerse casi constante para un máximo de siete moléculas de agua. Estos resultados indicarían que las interacciones de largo alcance entre las moléculas de agua son despreciables. Para un número mayor a siete hay un camino significativo en el mecanismo de interacción agua-CD. Para el metanol se encontraron configuraciones similares, mientras que en el caso del etanol y los alcoholes mayores, los complejos de inclusión solvente-CD son los habituales, o sea que el solvente se aloja en la cavidad. Estos resultados teóricos concuerdan con los hallazgos experimentales previos acerca de la formación de complejos del tipo 1:1 para moléculas con dimensiones mayores o iguales al etanol [141, 142].

En lo que quizás fue la primera aplicación publicada de la MM al estudio de los complejos de inclusión de las CDs, Tabushi desarrolló un modelo termodinámico para la inclusión de benceno, p-iodoanilina y anaranjado de metilo en α-CD en solución acuosa [89]. En este trabajo resulta de particular interés el uso de ecuaciones que consideran tanto la contribución entálpica de la geometría e interacciones indirectas entre el huésped y el anfitrión (i.e. MM) como las pro-

venientes de la solvatación por agua y la entrópica. Las energías libres de unión obtenidas mostraron una buena concordancia con los valores experimentales. En particular, se constató que la estabilidad neta del complejo se acentúa por el incremento de la entropía resultante del rompimiento de los racimos de agua de complejación alrededor de la molécula incluida apolar así como por la capacidad de la CD para adoptar una conformación de mayor energía local, todo lo cual en definitiva maximiza la estabilización proveniente de las interacciones entre vecinos no unidos directamente.

Una aproximación computacional mucho más simple consiste en tratar tanto a la CD como a la molécula huésped como especies rígidas e ignorar los factores de solvatación y flexibilidad interna. En esta línea de trabajo, Matsui [143] encontró que, considerando directamente las interacciones de van der Waals de las CDs con moléculas tales como 1-propanol y p-nitrofenol, se pueden reproducir las estructuras cristalinas provenientes de determinaciones por la técnica de rayos X de estos complejos. Sin embargo, las desviaciones de las estructuras calculadas respecto de las determinadas experimentalmente fueron significativamente mayores para huéspedes más reducidos, tales como el Kr y el metanol, lo cual hace suponer que este tipo de aproximación no es totalmente adecuada para el estudio de los complejos de inclusión de las CDs.

Linert y col. [141] emplearon una metodología similar para obtener una correlación grosera entre las energías libres de unión calculadas y las determinadas experimentalmente para las α- y β-CDs con una variedad de moléculas incluidas. Estos resultados de la MM se usaron para justificar algunas conclusiones derivadas de relaciones isocinéticas experimentales, las cuales podrían ser empleadas para clasificar a las moléculas huéspedes en familias con similares mecanismos de interacción con las CDs.

Otro conjunto de aportes se han dedicado a estudiar el mecanismo de unión y la orientación preferencial de la molécula huésped dentro de la cavidad de la CD. A tales efectos, se ha calculado la energía del complejo de función de la localización y la orientación del huésped a lo largo de un eje que pasa por el centro de la CD. Así, el análisis de varias curvas determinadas por el método MM2 para diversos isómeros del nitrofenol, nitroanilina y dihidroxibenceno, permi-

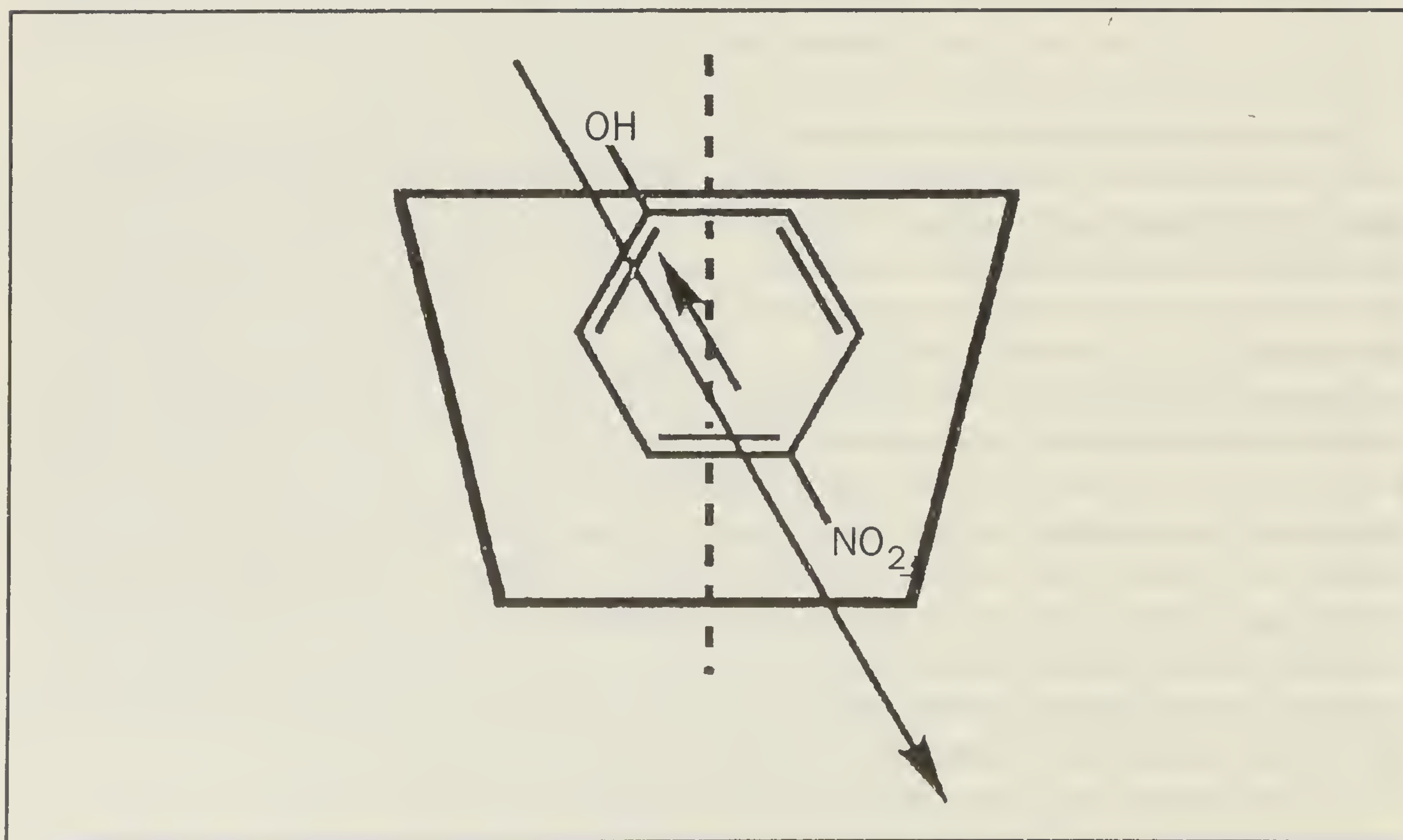



**Figura 5:** El gran momento dipolar calculado para la (α-ciclodextrina tiene como consecuencia que el p-nitrofenol se inserte con su vector momento dipolar en sentido opuesto al de la molécula anfitriona.

tió concluir que, por ejemplo, el p-nitrofenol prefiere un acercamiento y el enlace a la β-CD tal que el extremo del grupo -$NO_2$ se aproxima del lado de los hidroxilos secundarios. La geometría resultante del complejo es consistente con los datos provenientes de la determinación experimental por medio de rayos X. Asimismo, se encontró que el cálculo del cambio de energía de enlace se correlaciona en alguna medida con las constantes de disociación de seis de los complejos, deducidas de experimentos de voltametría cíclica.

En una publicación reciente, Elvira y col. [144] estudiaron algunas reacciones del tipo Diels-Alder en la cavidad de la β-CD, analizando la interacción entre este anfitrión y las estructuras de transición de las reacciones de ciclopentadieno con acrilonitrilo, metil-vinil cetona, acrilato de metilo, maleato de dietilo y fumarato de dietilo. La interacción entre la β-CD y los correspondientes estados de transición se calculó mediante un potencial de Lennard-Jones manteniendo fijas las estructuras del huésped y del receptor. La energía potencial se determinó en función de la posición del centro de masa del huésped y de los tres ángulos de Euler a fin de ubicar el mínimo global. Los resultados mostraron que en general el ciclo formado se aloja dentro de la cavidad, salvo en el caso del maleato de dietilo, donde esta parte se encuentra completamente fuera de aquélla, la cual ahora es ocupada por una de las cadenas del éster. Los autores pudieron explicar este comportamiento anómalo en base al análisis de la orientación del huésped dentro del receptor, destacando que no sólo la magnitud de la energía de interacción del huésped-β-CD es importante sino que se debe tomar en consideración del posicionamiento relativo de los dos componentes del complejo.

Jaime y col. han realizado una serie de estudios mixtos del efecto Overhauser nuclear intermolecular (NOE) y efectuaron cálculos con MM para determinar las geometrías de varios complejos de inclusión de CDs con moléculas orgánicas simples en solución [72, 99, 138, 145, 146]. Al encontrar una buena correlación entre ambas fuentes de resultados, los autores han sugerido que una combinación de cálculos del tipo MM2 y determinaciones NOE podrían constituirse en un medio idóneo y eficaz para determinar la geometría receptor-huésped.

Como estos estudios fueron realizados para las supermoléculas del complejo aislado y teniendo en cuenta que los experimentos se efectuaron sobre una muestra acuosa, en una publicación posterior [147] incluyeron al solvente en el análisis de los complejos de inclusión de las tres CDs con el 1-bromoadamantano. La comparación de los resultados con las determinaciones previas muestran la necesidad de incluir el efecto solvente en estos casos. Así, por ejemplo, el valor anormalmente alto de la energía de unión (125 kJ/mol para el complejo de β-CD) obtenido originalmente se había atribuido a la ausencia del solvente en los cálculos modelo con MM2 [138]. Esta suposición se confirmó luego [148] y la estabilización proveniente del término de energía de solvatación fue de 9.0 kJ/mol.

Ohashi y col. [137] han informado que el aplicar el método MMP2 [148] a la interacción de colorantes de cianina con β- y γ-CD se reproduce correctamente la estabilidad relativa de los complejos de inclusión y predice que en la mayoría de los casos se forma preferentemente un dímero en la cavidad de la CD. Las interacciones electrostáticas entre las moléculas de los colorantes y la CD juegan un papel central, además de las interacciones de van der Waals, en la estabilización del complejo. Asimismo, al realizar las consideraciones estéricas preliminares, los autores destacaron que el anillo de la β-CD debería sufrir alguna clase de expansión cuando se incluyen los dímeros en la cavidad. Este efecto sólo sería energéticamente factible en tanto el grado de desestabilización causado por la expansión del macroanillo fuera compensado por la estabilización debida a la interacción receptor hidrofóbico-huésped y a la dimerización del colorante. Este aspecto se analizó cuantitativamente en el transcurso del modelado y los resultados confirmaron las presunciones señaladas encontrando con ello una vez más las propiedades de flexibilidad de los anillos de las CDs.

En dos trabajos destinados a analizar los complejos de inclusión multimodales, Jaime y col. [72, 145] emplearon el método MM2(85) [149] para determinar correctamente las geometrías de

los complejos con moléculas totalmente distintas y también cuando las diferencias en los complejos son tan sutiles como las provenientes de las distintas formas enantioméricas de un mismo compuesto.

Recientemente Jursic y col. [150] han descripto una aproximación al proceso de inclusión a través de la optimización vía MM de los complejos de las CDs. Debido a la geometría específica de las CDs y el huésped considerado (*ter*-butil benceno), éste se desplaza a lo largo de un eje vertical que pasa por el centro de la cavidad. Este eje es perpendicular al plano medio de los átomos cetales de oxígeno que enlazan las unidades de glucosa. En cada paso del desplazamiento a lo largo de este eje se optimizó la geometría del complejo a fin de poder determinar al mínimo global. De acuerdo con lo esperado, la energía disminuye a medida que la molécula huésped penetra dentro de la cavidad de la β-CD y vuelve a aumentar al salir por el otro extremo de la cavidad. La rotación del huésped dentro de la cavidad, previa a la minimización, no produce una disminución de la energía final, por lo cual se deduce que el proceso de minimización es óptimo en el sentido de poder encontrar la mejor orientación del huésped. Se efectuaron los dos modos posibles de inserción: con el grupo arilo y a través del grupo ter-butilo, y los resultados mostraron que el primero es el preferido cuando aquélla se hace por la base mayor del cono. La energía de unión se calculó para dos valores muy distintos de la constante dieléctrica y los resultados fueron casi idénticos, de lo cual se infiere que la formación del complejo se estabiliza por las fuerzas dispersivas (van der Waals) y no por fuerzas electrostáticas (dipolo-dipolo o uniones por puentes de hidrógeno). Como la molécula huésped no posee grupos que puedan formar interacciones por uniones de hidrógeno, este resultado es cualitativamente correcto. El análisis de las estructuras optimizadas revela que la β-CD optimizada sin la molécula huésped en su interior es mucho más simétrica que aquélla del complejo y esto también está de acuerdo con lo hallado por Lipkowitz en cuanto a la relación simetría-estabilidad [139, 151].

Las CDs, en virtud de contener una cavidad para el enlace de moléculas substrato en un volumen no polar rodeado por grupos hidroxilo nucleofílicos, a menudo son empleadas como modelos de enzimas hidrolíticas, tal como la quimotripsina. En realidad, desde un punto de vista más estricto, la reacción observada es más a menudo una trans-acilación antes que una hidrólisis [152].

Estas características de las CDs han motivado estudios de modelado de simulación de la actividad enzimática. Por ejemplo, Breslow y col. [153] han "cerrado" uno de los extremos de la β-CD mediante la substitución en cada unidad glucosídica del grupo hidroxilo primario por un grupo N-alquil formamídico. Como consecuencia de la existencia de esta base impermeable en el extremo de menor diámetro del cono se constata un aumento marcado en la velocidad de transferencia del grupo acilo debido a la alteración de la geometría de enlace de la molécula substrato. A partir de cálculos con el campo de fuerzas AMBER [124, 154], Venenzi y col. [155] hallaron que la inserción de los "casquetes" (substitución del grupo hidroxilo por otro N-alquil formamídico) altera las orientaciones relativas de los anillos de glucosa y de los grupos hidroxilos secundarios en la parte superior del cono, y que no todos los grupos formamídicos prefieren localizarse en el extremo angostado. Sin embargo, a pesar de estos cambios, la distribución global del potencial electrostático no sufre grandes modificaciones, lo cual parece indicar que las fuerzas impulsoras del enlace permanecen inalteradas. El aumento de reactividad se atribuyó a la presencia de al menos un piso parcial, lo cual facilita la interacción del grupo acilo con los hidroxilos reorientados.

## *B. Dinámica Molecular*

La MM pone el énfasis en las geometrías correspondientes a los mínimos (globales o locales) de energía y por su propia naturaleza esta metodología brinda una perspectiva estática de

las CDs y sus complejos de inclusión. Sin embargo, es bien sabido que una visión más realista de estas estructuras debería incluir el parámetro temporal y así considerar fenómenos tales como las vibraciones y las rotaciones alrededor de los enlaces conformacionalmente móviles, al igual que rotaciones globales y traslaciones a través del espacio.

Las simulaciones por medio de los métodos de la dinámica molecular (DM) constituyen de esta manera una natural extensión y un refinamiento ulterior de los cálculos de la MM [156]. La segunda ley de Newton se puede aplicar a las funciones potenciales newtonianas de la MM ya que las masas de los átomos son conocidas y la fuerza que actúa sobre cada átomo es la suma vectorial de todas las interacciones contenidas en la función potencial. Solamente resta determinar la dirección y la magnitud del vector velocidad para cada átomo a un dado tiempo y una determinada temperatura.

En términos prácticos, las simulaciones por DM comienzan con una estructura que es previamente optimizada en forma total por MM. Luego se asigna a cada átomo y en forma aleatoria un vector velocidad correspondiente a una temperatura de inicio baja, usualmente 50 K. A partir de estas condiciones iniciales se comienza el ciclo iterativo, determinando por medio de la segunda ley de Newton tanto la magnitud como la dirección del vector velocidad atómica. Luego de alcanzado el equilibrio en el ciclo iterativo para unos pocos picosegundos, se pueden interpretar los movimientos de los átomos en términos de vibraciones moleculares reconocibles como tales, es decir estiramientos de enlaces, deformaciones angulares y demás modos normales. Posteriormente, la molécula se "calienta" a una temperatura prefijada (unos 300 K) por medio de pequeños incrementos a través del aumento de las velocidades de los átomos en un porcentaje constante y pequeño. Luego de alcanzada la temperatura deseada y antes que permitir que la simulación corra libremente, se deja equilibrar a la molécula en esa temperatura por unos 10 á 20 picosegundos, en cuyo lapso se pueden monitorear en función de la temperatura las diversas propiedades moleculares, tales como la geometría y la energía total.

Prabhakaran y Harvey [157] han efectuado la simulación por DM en fase gaseosa de la α-CD empleando el paquete GROMOS [128, 156]. La literatura muestra que existen varias conformaciones estables diferentes, lo cual es indicio de que esta molécula es menos estable estructuralmente que lo que habitualmente se supone y que además en solución es posible que exista un equilibrio dinámico entre dichas estructuras. Los cálculos de DM mostraron que en fase gaseosa la α-CD sufre cambios considerables en su geometría durante el transcurso de la simulación. Esto llevó a sugerir que tanto las moléculas huéspedes como las moléculas de agua en el cristal (no consideradas en los cálculos) y las fuerzas de empaquetamiento cristalino juegan un papel significativo en la determinación de las conformaciones existentes en la estructura cristalina. Así, la α-CD es bastante flexible desde el punto de vista conformacional a pesar de su forma toroidal, siendo los mayores cambios aquéllos que involucran un aplastamiento en los bordes de la estructura cíclica resultando entonces una variedad de formas cuasi-elipsoidales. Estos resultados están en concordancia con los hallados por Lipkowitz [139]. Por último, las unidades glucosídicas además tienden a mantener una conformación tipo silla.

A los fines de estudiar los efectos de la inclusión de substratos se simuló la introducción de una esfera y un plano dentro de la cavidad de la CD. Los resultados obtenidos muestran que algunos huéspedes desestabilizan la naturaleza circular del anillo de la CD, tal como sucede en el caso de la esfera, la cual induce grandes cambios conformacionales. Pero el substrato plano parece estabilizar la forma toroidal simétrica de la CD en el curso de la simulación, por lo cual resulta evidente que la simple presencia de un substrato no es suficiente para estabilizar el sistema. Van Gunsteren y col. han publicado estudios por DM de hidratos cristalinos de la α- y la β-CD así como de la α-CD en solución acuosa [158-162]. Los cálculos efectuados con el programa GROMOS pusieron en evidencia que se pueden duplicar tanto la localización como los movimientos de los átomos pesados con una precisión similar a la lograda en las determinaciones por rayos X de alta resolución y por dispersión neutrónica. Los errores que se encuentran en la pre-

dicción de la localización de los átomos de hidrógeno hidroxílicos y de las moléculas de agua son algo mayores y se deben a la movilidad acentuada de estos átomos, tanto en los cálculos como en las estructuras cristalinas. El método computacional también mostró ser capaz de modelar precisamente la naturaleza dinámica de la distribución de los puentes de hidrógeno en la CD, así como aquéllos formados con las moléculas de agua.

Por otra parte, la comparación entre los resultados de la α-CD cristalina exahidratada y de su similar solvatada reveló que los átomos que componen el ciclo son aproximadamente dos veces más móviles en solución que en el cristal. Así, la estructura promediada en el tiempo de la α-CD en solución difiere significativamente de la forma cristalina y la posición de los átomos llega a desviarse tanto como 1 A respecto de la estructura del cristal. A pesar de estos grandes desvíos temporales locales, la CD adopta una simetría de grado 2 en el estudio en solución, lo cual indica la existencia de una forma dinámica elíptica antes que una circular simétrica. La distribución de enlaces por puentes de hidrógeno de la CD también demostró ser más compleja y de menor duración en el modelo solvatado. Como conclusión, los autores destacaron que las estructuras cristalinas representan solamente una de las posibles conformaciones de la CD y sólo una de las diversas distribuciones de unión hidrógeno posibles que son accesibles a las moléculas en solución. Otro resultado cualitativamente interesante es que la simulación en solución demostró que pueden existir uniones hidrógeno de tres centros como formas intermedias en la interconversión de uniones por puentes de hidrógeno normales a dos centros. Estas uniones a tres centros son mucho más numerosas en solución y de menor duración que las correspondientes a las estructuras cristalinas.

En una reciente publicación, Amisaki y col. [163] realizaron un estudio por DM de la α-CD ramificada. Este es un derivado de la α-CD con una rama consistente en una unidad extra de glucosa. Su solubilidad en agua es considerablemente mayor que la α-Cd "normal" y en este trabajo se analizó dicha propiedad. A tales efectos, se empleó el programa GROMOS en tres entornos distintos: en el vacío, en el estado cristalino y en solución acuosa. La simulación *in vacuo* se efectuó para explorar las conformaciones estables de la molécula en el sistema aislado. La bondad de las simulaciones se contrastó comparando los valores determinados por rayos X y las estructuras cristalinas modeladas.

Los resultados de las simulaciones muestran tres características sobresalientes de la estructura de la molécula: autoinclusión de su porción ramificada, conformación de bote del anillo de glucosa y movimiento de balanceo del macrociclo. Entre estas tres características, la última está íntimamente vinculada a la solubilidad de la molécula en agua. La solubilidad de la α-CD no ramificada parece estar gobernada principalmente por las uniones hidrógeno interglucosídicas, las cuales inhiben la hidratación por las moléculas del solvente agua. Los resultados de esta simulación indican que la capacidad de formar uniones por puentes de hidrógeno en la α-CD ramificada decrece en la medida que la molécula pierde su forma circular regular. El movimiento de balanceo se observó en una escala de tiempo relativamente corta (varios picosegundos) y la inserción de una unidad extra de glucosa en la α-CD puede originar un mayor grado de solubilidad de la molécula a través de un balanceo mayor de su macrociclo.

## *C. Métodos de cálculo semiempíricos de la teoría de orbitales moleculares*

Inoue y col. han sido los pioneros en desarrollar la aplicación de los cálculos basados en la teoría de orbitales moleculares para determinar la capacidad de las CDs para formar complejos de inclusión [73, 164-175]. Estos autores han recurrido al procedimiento semiempírico CNDO/2 [117] para investigar las interacciones entre los dipolos de las CDs y sus moléculas huéspedes así como para explorar la geometría de unión por medio de las correlaciones entre los corrimientos calculados de $^{13}C$ y los determinados experimentalmente.

El método CNDO/2 se eligió para esta clase de estudios debido a que su simplicidad computacional permite garantizar el análisis de sistemas moleculares grandes, complejos y conformacionalmente móviles, como lo son las CDs y sus complejos de inclusión. Si bien al presente este método ha sido superado y reemplazado en su empleo habitual por procedimientos semiempíricos más sofisticados, los cálculos en base al CNDO/2 han demostrado eficacia en el suministro de descripciones adecuadas tanto de las geometrías moleculares como de los momentos dipolares y de los corrimientos químicos.

La capacidad de las CDs para unirse a diversas moléculas orgánicas más pequeñas ha sido tradicionalmente asignada a fuerzas hidrofóbicas, sirviendo la cavidad interna de cada CD como un microentorno no polar para captar las moléculas de los substratos no polares del medio externo acuoso. Sin embargo, Inoue y col. han postulado que las CDs pueden tener un momento dipolar inesperadamente grande y en consecuencia generar un campo eléctrico fuerte dentro de sus cavidades. Por tal motivo, ellos propusieron que los efectos electrostáticos (a través de interacciones tipo dipolo-dipolo) pueden jugar un papel esencial en el enlace y la determinación de la orientación del huésped dentro del complejo.

En una de sus comunicaciones iniciales [164] calcularon el momento dipolar de la α-CD cuando se compleja respectivamente con el p-nitrofenol, el ácido benzoico y el ácido p-hidroxibenzoico. En el primer caso se encontró que la molécula de la α-CD posee un momento dipolar inusualmente grande (13,5 D), el cual está orientado desde el lado de los hidroxilos secundarios (borde más amplio) hacia el lado de los hidroxilos primarios (borde más estrecho). Debido a las pequeñas distorsiones de las unidades glucosídicas, el eje del dipolo forma un ángulo de 30° con el eje vertical del cono de la CD. A su vez, el vector momento dipolar del huésped p-nitrofenol posee una magnitud de 5,0 D y su dirección es la misma que la del vector momento dipolar de la α-CD, pero su sentido es el inverso, según muestra la Figura 5.

Esta propuesta novedosa respecto de las concepciones previas acerca de la naturaleza de las fuerzas de enlace en los complejos de inclusión de las CDs y que considera que la cavidad de ellas constituye un ambiente marcadamente polar para concretar la unión con el huésped, fue confirmada a través del cálculo de los mapas de potencial electrostático [169] para el interior de la α-CD cuando es perturbada por la presencia de las moléculas incluidas. La exploración de la energía potencial dentro de la cavidad por medio de una carga testigo permitió hallar regiones potenciales moderadamente negativas y positivas, de magnitud comparable a las paredes de potencial que existen alrededor de los pares solitarios en las moléculas de agua. Debe destacarse que la topología y la magnitud de la superficie de potencial están estrechamente vinculadas a (y son manifiestamente dependientes de) la conformación del anillo macrocíclico, el cual depende, a su vez, de la naturaleza de las moléculas receptadas (en este caso, p-nitrofenol o dos moléculas de agua). Esto implica que el anillo de la CD sufre cambios conformacionales a los fines de maximizar las atracciones electrostáticas entre el huésped y el anfitrión.

En dos trabajos posteriores [73,170] estos autores extendieron esta clase de estudios a una variedad de huéspedes de las CDs y arribaron a conclusiones similares. Se encontró que todas las CDs poseen momentos dipolares grandes orientados hacia el lado de los hidroxilos primarios y formando un ángulo con el eje principal del cono truncado. Las intensidades relativas son α-CD < β-CD < γ-CD. La magnitud y orientación del dipolo de las CDs están fuertemente influidos por los cambios conformacionales en el macrociclo resultante del proceso de complejamiento con una determinada molécula huésped. Inoue y col. han atribuido esta peculiaridad a una característica específica que denominaron **"efecto macrocíclico"**, en el cual la suma de los efectos de las sub-unidades normales (i.e. cada residuo glucosídico posee un valor típico del momento dipolar) se combinan de manera tal que forman una macromolécula con propiedades inusuales a través de una acción cooperativa [170]. También se postuló un mecanismo de **"ajuste inducido"** por el cual la molécula de CD posee la libertad de adoptar cambios conformacionales que le permiten maximizar la energía de estabilización proveniente de las interacciones de di-

polos localizados. En consecuencia, los momentos dipolares de las moléculas huéspedes se orientan en el sentido opuesto al de la CD. De todo esto los autores concluyen que el término **"bolsillo hidrofóbico"** puede ser insuficiente para llegar a describir el carácter de las cavidades de las CDs [73].

Ya hemos puntualizado que la espectroscopía NMR del $^{13}C$ es uno de los métodos experimentales más valiosos para estudiar la estructura y la dinámica del proceso de complejamiento CD-huésped, tanto en solución como en el estado sólido. Esto se debe al hecho de que los átomos de C incluidos dentro de la cavidad relativamente no polar de la CD se ven afectados y experimentan un entorno magnético distinto de aquellos otros que permanecen expuestos al ambiente externo. El método CNDO/2 ha demostrado ser útil para investigar los cambios en los desplazamiento químicos e Inoue y col. lo han aplicado para correlacionar las medidas espectroscópicas con la geometría anfitrión-huésped en los complejos de inclusión de las CDs [171-175].

Estos autores simularon la unión de la molécula substrato en el cavidad de la CD a través de un modelo bifásico, en el cual la cavidad de la CD se modela por medio de un campo con constante dieléctrica $\varepsilon = 2$ y a la fase exterior se le asigna una constante dieléctrica $\varepsilon = 80$ (correspondiente al agua). La comparación de los cambios calculados para los corrimientos químicos con aquéllos determinados experimentalmente permite deducir con un buen grado de credibilidad cuáles son los átomos del huésped que se encuentran alojados dentro de la cavidad del receptor. Este modelo fue refinado a través de su extensión tridimensional, considerando que la cavidad de la CD es un cilindro no polar en un medio acuoso extendido [175]. Tal procedimiento ofrece una mejor descripción de los efectos de las condiciones de contorno entre los dos volúmenes de polaridades distintas sobre los cambios en los desplazamientos químicos.

En un trabajo de reciente publicación [176] Lichtenthaler y col. han descripto un procedimiento de simulación computacional para explicar las propiedades químicas y biológicas de la sacarosa, la amilosa y las CDs. Estos autores generaron ciertas áreas específicas sobre la superficie de las moléculas por medio del programa MOLCAD [131], las cuales suministran una nueva perspectiva acerca de la arquitectura molecular, la reactividad química y las propiedades biológicas. El paquete de programas MOLCAD es un algoritmo computacional interactivo y de rápida ejecución para construir y manipular moléculas y sistemas moleculares. En especial, es apropiado para analizar y representar distintas propiedades físicas de las moléculas, como por ejemplo el potencial electrostático molecular (MEP) sobre superficies sólidas moleculares tridimensionales correspondientes a especies moleculares con muchos átomos, tal como lo son las CDs.

Las áreas específicas mencionadas más arriba son las regiones electropositiva y electronegativa sobre la superficie de contacto de las moléculas, las cuales pueden ser determinadas con precisión y representadas por un código de colores de fácil visualización. Asimismo, las áreas de hidrofilicidad e hidrofobicidad pueden ser generadas a partir de los potenciales de liofilicidad molecular (MLPs). Las distribuciones del MEP y MLP, destacadas sobre la superficie accesible al solvente en forma de códigos coloreados suministran una herramienta muy útil para analizar a las CDs y sus complejos de inclusión.

El hecho de que la cavidad de las CDs posea propiedades hidrofóbicas está bien establecido en base a su capacidad para formar complejos de inclusión. Sin embargo, no se puede inferir claramente qué áreas son hidrofóbicas y cuáles son hidrofílicas (recuérdese que las CDs son bastante solubles en agua), a partir de las fórmulas químicas, los modelos o las superficies de contacto [177]. La generación de los perfiles de potencial de hidrofobicidad provee una excelente ilustración acerca de cómo las CDs se encuentran balanceadas con respecto a sus áreas hidrofílicas e hidrofóbicas (ver Figura 15 en la referencia 176). En efecto, los resultados muestran que una parte de estas moléculas (la base mayor del cono) es fuertemente hidrofílica mientras que la parte más angosta lo es considerablemente menos y está parcialmente permeada por un área hidrofóbica. Sin embargo, el grueso de la región hidrofóbica está concentrado en el interior de la cavidad, tal como se ha venido considerando hasta el presente. Entonces, los perfi-

les MLP suministran otra poderosa herramienta para estudiar el proceso mismo de formación de los complejos de inclusión de las CDs.

## 4. CONCLUSIONES

A pesar de los numerosos estudios experimentales, las características que hacen tan especiales a las CDs en lo atinente a su capacidad para formar complejos con moléculas más pequeñas y acelerar las velocidades de ciertas reacciones químicas, todavía no se comprenden totalmente ni se conocen sus mecanismos internos. Las técnicas computacionales derivadas de la química teórica, tanto en el terreno de la MM como de la DM y la teoría de los orbitales moleculares, suministran medios complementarios de gran valor y significación para aislar y entender a cada uno de los factores que determinan la fuerza y la geometría del enlace, así como los efectos que la complejación puede tener sobre la reactividad orgánica.

Los diversos estudios computacionales que se han descripto en la sección previa indican que las CDs proveen algo más que un espacio no polar rígido que puede ocupar el substrato. Se pudo apreciar que la naturaleza de las fuerzas de enlace es variada y está conformada por una suma de componentes tales como las atracciones de van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones del huésped y del anfitrión con el solvente, cambios conformacionales, generación de fuerzas dipolares, factores entrópicos, etc. Asimismo, en algunos casos se pueden establecer relaciones cuali y/o cuantitativas entre ellos y al mismo tiempo hallar correlaciones significativas y válidas con distintas clases de datos experimentales.

El empleo de los métodos teóricos, al igual que el uso inteligente de las técnicas experimentales en el modelado molecular de las CDs y sus complejos de inclusión, a menudo plantea más preguntas que respuestas. Sin embargo, es dable pronosticar que los avances continuos tanto de hardware como de software habrán de brindar excelentes medios de cómputo para arribar a un cálculo directo y de naturaleza dinámica del acto de unión entre una CD y la molécula alojada, ya sean aislados o bañados en un solvente, permitiendo así una cuasi disección y cuantificación correcta de las fuerzas de unión a nivel molecular. Los avances tecnológicos también permitirán extender los cálculos teóricos para considerar no sólo las propiedades estáticas de las CDs y sus complejos sino también investigar las geometrías y las energías de las estructuras de transición en las reacciones químicas catalizadas por las CDs. Una comprensión detallada y bien fundamentada en la faz teórica a nivel molecular puede servir de segura referencia para el diseño racional de nuevos materiales basados en las CDs y con propiedades preasignadas, tales como las necesarias para poder emplearlos como medios eluyentes en cromatografía o catalizadores eficientes para diversas reacciones orgánicas.

## REFERENCIAS

1. J . M. Lehn, Proc. Indian Acad. Sci. Chem. Sci. 106 (1994) 915,
2. R. J. Bergeron, J. Chem. Educ. 54 (1977) 204.
3. *M. L. Bender and M. Komiyama, Cyclodextrin Chemistry,* Springer, Berlin, 1978.
4. W. Saenger, Angew. Chem. Int. Ed. Ingl. 19 (1980) 343.
5. J. Szejtli, *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Akademiaia Kiado, Budapest, 1982.
6. W. Saenger, in *Inclusion Compounds* Vol. 2, J. L. Atwood, J. E. D. Davis and D. D. Mac Nicol, Eds., Academic Press, London, 1984, p. 231.
7. J. F. Stoddart, Ed. Carbohydr. Res. 1989, 192.
8. D. Duchene, Ed., *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, Editions de la Santé, Paris, 1991.

9. G. WENS, Angew. Chem. Int. Ed. Ingl. 33 (1994) 803.
10. P. R. SUNDARARAJAN AND V. S. R. RAO, Carbohydr. Res. 13 (1970) 351.
11. D. FRENCH, A. O. PULLEY, J. A. EFENBURGER, M. A. ROUGVIE AND M. ABDULLAH, Arch. Biochem. Biophys. 111 (1965) 153.
12. A. O. PULLEY AND D. FRENCH, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5 (1961) 11.
13. J. SZEJTLI, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer, Dordrecht, 1988, Chapter 2.
14. A. HOCHGESAND, G. WENZ, in *Minutes of the 5th. International Symposium on Cyclodextrins*, D. Duchene, Ed., Editions de la Santé, Paris, 1990, p. 322.
15. G. WENS, Carbohydr. Res. 214 (1991) 2257.
16. P. R. ASHTON, P. ELLWOOD, Y. STATON AND J. F. STODDART, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30 (1991) 80.
17. P. R. ASHTON, P. ELLWOOD, Y. STATON AND J. F. STODDART, J. Org. Chem. 56 (1991) 7274.
18. H. YAMAMURA AND K. FUJITA, Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 2505.
19. A. GADELLE AND J. DEFAYE, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30 (1991) 78.
20. H. YAMAMURA, T. EZUKA, Y. KAWASE, M. KAWAI, Y. BUTZUGAN AND K. FUJITA, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1993, 636.
21. D. DUCHENE, Ed. *Cyclodextrins and their Industrial Uses,* Editions de la Santé, Paris, 1987.
22. S. LI AND C. PURDY, Chem. Rev. 92 (1992) 1457.
23. S. SASAKI, Y. TAKAI AND K. KOGA, Tetrahedron Lett. 31 (1990) 6051.
24. F. VOGTHE, *Supramolecular Chemistry: An lntroduction*, Wiley, New York, 1991.
25. R. W. SOUTER, *Chromatografic Separations of Stereoisomers*, CRC Press, Boca Raton, 1985.
26. S. G. ALLENMARK, *Chromatografic Enantioseparation. Methods and Applications*, Ellis Horwood, Chichester, 1988.
27. D. STEVENSON AND Y. D. WILSON, Eds. *Chiral Separations*, Plenum Press, New York, 1988.
28. I. W. WAINER, *Practical Guide to the Section and Use of HPLC Chiral Stationary Phases*, J. T. Baker, Phillipsburg, 1988.
29. M. ZIEF AND L. J. CRANE, Eds. *Chromatographic Chiral Separations*, Marcel Deker, New York, 1988.
30. W. J. LOUGH, Ed., *Chiral Liquid Chromatography*, Blackie & Son, London, 1989.
31. *G. Bottoni, G. Chiarabaglio, L. Moro and S. Rigamonti, Il Prodotto Chimico,* 4, ottobre, 1984.
32. K. H. FROMMING, Pharm. unserer Zeit. 2 (1973) 109.
33. T. S. JONES, D. J. W. GRANT, J. HADGRAFT AND G. TARR, Acta Pharm. Tech. 30 (1984) 213, 263.
34. M. KATA, Gyóyszerészet 28 (1984) 405.
35. M. NAMBU, Farumashia 16 (1980) 33.
36. J. PITHA, L. SZENTE AND J. SZEJTLI, in *Controlled Drug Delivery*, S. D. Bruck, Ed., Vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1983, p. l 25.
37. J. SZEJTL, Die Starke 29 (1977) 26.
38. J. SZEJTLI, in *Controlled Drug Bioavailability*, W. F. Smolen and L. A. Ball, Eds., Vol. 3, Wiley, New York, p. 365.
39. K . UEKAMA, Yakugaku Zasshi, 101 (1981) 857.
40. K. UEKAMA, Fragance 11 (1983) 68.
41. K. UEKAMA, Denpum Kagaku, 30 (1983) 247.
42. O. N. YALCINDAG, Turk. Hij. Deneysel. Biyol. Derg. 40 (1983) 321.
43. S. KOBAYASHI AND K. KAINUMA, Shokulin Kogyo 24 (1981) 34.
44. S. KOBAYASHI, Fragance, 11 (1983) 73.

45. T. Komeda and S. Arai, Shokuhin to Kagaku 19 (1977) 97.
46. N. Nakamura, Shokulin to Nagaku 21 (1979) 110.
47. M. Okada, New Food Ind. Japan 26 (1984) 22.
48. J. Szejtli, Starke 34 (1982) 379.
49. J. Szejtli, Proc. 1st. Int. Symp. Cyclodextrins, S. Szejtli Ed., Reidel, Dordrechet and Akadémiai Kiadó, 1982, p. 469.
50. J. Tan, Shipin Yu Fajiao Gongye 1 (1984) 43.
51. J. Szejtli in *Inclusion Compounds* Vol. III, J. L. Attwood, J. E. D. Davies and D. D. MacNicol, Eds., Academie Press, London, 1984.
52. A. Mifune and A. Shima, Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi 35 (1977) 116.
53. Y. Minamite and Y. Kaksuda, Denpun Kagaku 31 (1984) 112.
54. J. Szejtli, Oláh Novényvédelem, Budapest 19 (1983) 364.
55. J. Szejtli, Starch 37 (1985) 382.
56. I. Yamamoto, Fragance 83 (1983) 95.
57. I. Yamamoto and I. Katsuda, Pestic. Sci. 11(1980) 134.
58. D. D. MacNicol and D. S. Rycroft, Tetrahedron Lett. 25 (1977) 2173.
59. D. D. MacNicol, Tetrahedron Lett. 38 (1975) 3325.
60. A. Neszmélyt. A. Liták, P. Nánási and J. Szejtli, Acta Chim. Hung. 113 (1983) 431.
61. H. Kondo, H. Nakadami and K. Hiromi, J. Biochem. 79 (1976) 393.
62. C. J. Seliskar and L. Brand, Science, 171 (1971) 799.
63. F. Cramer, W. Saenger and H. Spatz, J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 14.
64. I. Miwa and J. Ikuda, Rinsho Kagaku 13 (1984) 93.
65. I. Miwa and J. J. Marshall, Chem. Pharm. Bull. 30 (1982) 362.
66. K. Wallenfeld, B. Meltzer, G. Laule and G. Janatsch, Fresenius Z. Anal. Chem. 301 (1980) 169.
67. K. Wallenfels (Behringwerke A-G), Ger. Offen. 3, 000 (1981) 292.
68. B. Dolabjian and U. Wuerzburg (Merck Patent GmbH) Ger. Offen DE 3, 301 (1984) 956.
69. R. A. Kaufman, American Hospital Supply Corp. PCT Int. Appl. WO 83, 00 (1983) 876.
70. T. Kinoshita, Kagaku to Seibutsu 13 (1975) 392.
71. D. L. Witte, B. J. Pennel, J. K. Pfohl and R. D. Feld, Am. J. Clin Pathol. 76 (1981) 86.
72. M. Fathallah, F. Fotiadu and C. Jaime, J. Org. Chem. 59 (1994) 1288.
73. M. Kitagawa, H. Hoshi, M. Sakurai, Y. Inone and R. Chujó, Bul. Chem. Soc. Jpn. 61 (1988) 4225.
74. B. Guillet, D. J. Nicole and J. J. Delpuech, Tetrahedron Lett. 23 (1982) 65.
75. D. A. Rees, J. Chem. Soc. 8 (1970) 877.
76. W. Saenger, M. Noltemeyer, P. C. Manor, B. Hingerty and B. Klar, Bioorg. Chem. 5 (1976) 187.
77. B. Casu, G. G. Gallo, M. Reggiani and A. Vigevani, Chem. Soc. (London) Spec. Pub. No. 23 (1968) 217.
78. Ref. 13, p. 10.
79. K. Myrback and I . Jarnesrom, Arkiv Kemi 1 (1949) 129.
80. J. Boger, R. Corcoran and J. M. Lehn, Helv. Chim. Acta 61 (1978) 2190.
81. A. Croft and R. A. Bartsch, Tetrahedron 39 (1983) 1417.
82. D. French, Adv. Carbohyd. Chem. 12 (1957) 189.
83. A. Lipták, P. Fugesi, Z. Szurmai, J. Imre and J. Szejtli, Proc. 1st. Int. Symp. Cyclodextrins, J. Szejtli, Ed., Reidel, Dordrecht, 1982, p. 275.
84. F. Cramer and H. Hettler, Naturwiss, 54 (1967) 625.
85. K. A. Connors, Proc. 1st. Int Symp. Cyclodextrins, J. Szejtli, Ed. Reidel, Dordrecht, 1982, p. 163.

86. R. J. Bergeron, D. M. Pillor, G. J. Gibeily and W. P. Roberts, Bioorg. Chem. 7(1978) 253.
87. R. J. Bergeron, M. A. Channing and K. A. McGovern, J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 2878.
88. Y. Matsui and K. Mochida, Bull. Chem. Soc. Jpn 52 (1970) 2808.
89. I. Tabushi, Y. Kiyosuke, T. Sugimoto and K. Yamamura, J. Am. Chem Soc 100 (1978) 916.
90. M. L. Grayeski and E. Woolf; Anal. Appl. Biolumin. Chemilumin. (Proc. Int. Symp.) 3rd., L. J Kricka, Ed., Academic Press, London, p. 565.
91. R. J. Bergeron; M. A. Channing, G. J Gibeily and D. M. Pillor, J. Am. Chem. Soc 99 (1977) 5146.
92. R. J. Bergeron. Ref. 6, p. 391.
93. B. Hingerty and W. Saenger, J. Am. Chem. Soc. 98 (1976) 3357.
94. R. J. Bergeron and M. Meeley, Bioorg Chem. 5 (1976) 197.
95. F. Cramer, Angew. Chem. 68 (1956) 115.
96. F. Cramer and W. Kampe, J Am. Chem Soc. 87 (1965) 1115.
97. R. L. van Etten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes and A. Bender, J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 3242.
98. D. E. Tutt and M. A. Schwartz, J Chem. Soc Commun. (1970) 113.
99. C. Jaime, J. Redondo. F. Sánchez-Ferrando and A. Virgili, J. Molec. Struct. 248 (1991) 317
100. A. Orstan and J. B. A. Ross, J .Phys. Chem. 91 (1987) 2739.
101. W. Schlenk and V. M. Sand, J. Am. Chem. Soc 83 (1961) 2312.
102. M. Komiyama and M. L. Bender, J. Am. Chem. Soc. 100 (1978) 2259.
103. A. Hersey and B. H. Robinson. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 80 (1984) 2039.
104. E. A. Lewis and L. D. Hansen, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1973) 2081.
105. F. Cramer, Angew. Chem. 64 (1952) 136.
106. K. Takeo and T. Kuge, J. Agr. Biol. Chem. 36 (1972) 2615.
107. J. A. Hamilton L. K. Steinrauf, R. L. van Etten, Acta Crystallogr. Sect. B 24 (1968) 1560.
108. D. J. Wood, F. E. Hruska and W. Saenger, J. Am. Chem. Soc. 99 (1977) 1735.
109. K. Flohr, R. M. Patton and E. T. Kaiser, J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 1209.
110. S. Dong and D. Zhang, Acta Chim. Sin. 46 (1988) 335.
111. R. Ismin, C. Slam and A. K. Kaifer, J. Org. Chem. 56 (1991) 35.
112. I. Tabushi, Acc. Chem. Res. 15 (1982) 66.
113. M. R. Eftink, M. Andy, K. Bystrom, H. D. Perlmutter and D. S. Kristol, J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 6765.
114. K. Harata, Bull. Chem. Soc. Jpn. 49 (1976) 2066.
115. J. E. D. Davies, Ed., *Spectroscopic and Computational Studies of Supramolecular Systems*, Kluwer, Dordrecht, 1992.
116. A. D. French and J. W. Brady, Eds., *Computer Modeling of Carbohydrate Moleculaes*, American Chemical Society, Washington, D. C., 1990.
117. J. A. Pople and D. L. Beveridge, *Approximate Molecular Orbital Theory*, McGraw-Hill, New York, 1970.
118. U. Burkert and N. L. Allinger, *Molecular Mechanics*, A. C. S. Monograph No 177, American Chemical Society, Washington, D. C., 1982.
119. N. L. Allinger and Y. Yuh, MM2 Program, QCPE 395, Quantum Chemistry Program Exchange, Indiana University, Indiana.
120. K. M. Merz and B. H. Beswler, MOPAC-ESP Program, QCPE 589, Quantum Chemistry Program Exchange, Indiana University, Indiana.

121. K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Eds., *Reviews in Computational Chemistry*, Vols. 1-9, VCH Publishers Inc., New York, 1991 - 1996.
122. Quanta/CHARMm, Molecular Simulations, Warmshurst, Massachusetts, U.S.A.
123. W. G. Richards, Ed., *Computer Aided Molecular Design*, IBC Technical Services, 1989.
124. AMBER Program, S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen and L. A. Case, J. Comput. Chem. 7 (1986) 230.
125. W. S. Still, MACROMODEL, Columbia University, New York, U.S.A.
126. INSIGHT/DISCOVER, Software, Biosym. Inc., San Diego, California, U. S. A.
127. C. J. Cramer, G. C. Lynch and D. G. Truhlar, AMSOL3.0.1, QCPE 606, Quantum Chemistry Program Exchange, Indiana University, Indiana.
128. W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen, 1988.
129. J. Koehler, *Molecular Dynamics: Applications in Molecular Biology*, J. M. Goodfellow, Ed., The MacMillian Press, London, 1991, pp. 69-106.
130. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren and J. Hermans, *Intermolecular Forces*, B. Pullman, Ed., Reidel, Dordrecht, 1981, pp. 331-342.
131. J. Birckman, *MOLCAD - Molecular Computer Aided Design,* Technische Hochschule, Darmstadt, 1992.
132. F. M. Menger and M. M. Sherod, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2485 (1988) 1509.
133. B. Waszkowycz, Y. H. Hillies, N. Gensmantel and D. W. Payling, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 285 (1988) 1259.
134. K. B. Lipkowitz, J. Chem. Educ. 72 (1995) 1070.
135. M. J. Sherrod, Carbohydr. Res. 192 (1989) 17.
136. T. X. Lu, D. B. Zhang and S. J. Dong, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 285 (1989) 1439.
137. M. Ohashi, K. Kasatni, H. Shinohara and H. Sato, J. Am. Chem. Soc. 112 (1990) 5824.
138. C. Jaime, J. Redondo, F. Sánchez-Ferrando and A. Virgili, J. Org. Chem. 55 (1990) 4772.
139. K. B. Lipkowitz, J. Org. Chem. 56 (1991) 6357.
140. W. Linert, P. Margl and I. Lukovits, Computers Chem. 16 (1992) 61.
141. W. Linert, L. F. Han and I. Lukovits, Chem. Phys. 139 (1989) 441.
142. I. Lukovits, J. Molec. Struct. THEOCHEM 170 (1988) 249.
143. Y. Matsui, Bull. Chem Soc. Jpn. 55 (1982) 1246.
144. E. Elvira, C. Caltiviela, J. I. García and J. A. Mayoral, Tetrahedron Lett. 36 (1995) 2129.
145. F. Pérez, X. Sánchez-Ruiz and C. Jaime, J. Org. Chem. 60 (1995) 3840.
146. F. Fotiadu, M. Fathallah and C. Jaime, J. Inclusion. Phen. 16 (1993) 55.
147. P. M. Ivanov and C. Jaime, J. Molec. Struct. 377 (1996) 137.
148. J. J. Gajweski, K. E. Gilbert, and J. McKelvey, Adv. Mol. Modeling 2 (1990) 65.
149. N. L. Allinger, Molecular Design Ltd, 2132 Farallon Dr., San Leandro, CA 94577, U.S.A.
150. B. S. Jursic, Z. Zdravkowski and A. D. French, J. Molec. Struct. THEOCHEM 366 (1996) 113.
151. K. B. Lipkowitz, K. Green and J. Yang, Chirality 4 (1992) 205.
152. H. Dugas, *Bioinorganic Chemistry*, 2nd. ed., Springer, New York, 1989.
153. R. Brelow, M. F. Czarmiecki, J. Emert and H. Hamaguchi, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 762.
154. P. K. Weimer and P. A. Kollman, J. Comput. Chem. 2 (1981) 287.
155. C. A. Venanzi, P. M. Canzins, Z. Zhang and J. D. Bunce, J. Comput. Chem. 10 (1989) 1038.
156. W. F. van Gunsteren and H. J. C. Berendsen, Angew. Chem. Intl. Ed., Engl. 29 (1990) 992.

157. M. PRABHAKARAN AND S. C. HARVEY, Biopolymers 26 (1987) 1087.
158. J. E. H. KOEHLER, W. SAENGER AND W. F. VAN GUNSTEREN, Eur. Biophys. J. 15 (1987) 197.
159. J. E. H. KOEHLER, W. SAENGER AND W. F. VAN GUNSTEREN, Eur. Biophys. J. 15 (1987) 211.
160. J. E. H. KOEHLER, W. SAENGER AND W. F. VAN GUNSTEREN, J. Biomol. Struct. 6 (1988) 181.
161. J. E. H. KOEHLER, W. SAENGER AND W. F. VAN GUNSTEREN, J. Mol. Biol. 203 (1988) 241.
162. J. E. H. KOEHLER, W. SAENGER AND W. F. VAN GUNSTEREN, Eur. Biophys. J. 16 (1988) 153.
163. T. AMISAKI, T. FUJIWARA AND S. KOBAYASHI, J. Mol. Graphics 12 (1994) 297.
164. M. KITIGAWA, H. HOSHI, M. SAKURAI, Y. INONE AND R. CHUJO, Carbohydr. Res. 163 (1987) cl.
165. Y. YAMAMOTO, M. ONDA, M. KITAGAWA, Y, INONE AND R. CHUJO, Carbohydr. Res. 167 (1987) cl l.
166. Y. INONE, T. OKUDA, Y. MIYATA AND R. CHUJO, Carbohydr. Res. 125 (1984) 65.
167. Y. INONE, Y. KATONO AND R. CHUJO, Bull. Chem. Soc. Jpn. 52 (1979) 1692.
168. Y. INONE, Kagaku (Iwanami) 55 (1985) 710.
169. M. SAKURAI, M. KITIGAWA, H. HOSHI AND R. CHUJO, Chem. Lett. (1988) 895.
170. M. KITAGAWA, H. HOSHI, M. SAKURAI, Y. INONE AND R. CHUJO, Carbohydr. Res. 198 (1990) 181.
171. Y. INONE, H. HOSHI, M. SAKURAI AND R. CHUJO, J. Incl. Phenom. 2 (1984) 565.
172. Y. INONE, H. HOSHI, M. SAKURAI AND R. CHUJO, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 2319.
173. Y. INONE, M. KITIGAWA, H. HOSHI, M. SAKURAI AND R. CHUJO, J. Incl. Phenom. 5 (1987) 55.
174. M. SAKURAI, M. KITIGAWA, H. HOSHI, Y. INONE AND R. CHUJO, Bull. Chem. Soc. Jpn 62 (1989) 2067.
175. M. SAKURAI, H. HOSHI, Y. INONE AND R. CHUJO. Chem. Phys. Lett. 163 (1989) 217.
176. F. W. LICHTENTHALER AND S. IMMEL, Int. Sugar J. 97 (1995) 12.
177. S. IMMEL, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, 1994.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (117 - 138)

# CITOTOXICIDAD DE *O*-NAFTOQUINONAS LIPOFILICAS: RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

*Andrés O.M. Stoppani*, Marta Dubin*, Silvia H. Fernández Villamil*, María P. Molina Portela*, Ana M. Biscardi*, Corrado Galeffi** y Margot Paulino****

**Palabras Claves:** *o*-Naftoquinonas; lapachonas; mansononas; tripanosomas; radicales libres; citotoxicidad; quimioterapia; cáncer; virosis; daño oxidativo.

## RESUMEN

*o*-Naftoquinonas, como la β-lapachona, que fueran antes propuestas como agentes antichagásicos, han resultado potentes inhibidoras del crecimiento de células tumorales humanas, lo que ha renovado el interés por esas quinonas. Por ello, se revisan ahora los mecanismos de la citotoxicidad de varias *o*-naftoquinonas y moléculas similares, representadas por la β-lapachona y las mansononas. Esas quinonas son reactivas con sistemas enzimáticos complejos, como el sistema NADPH-P450 microsomal hepático, protozoarios y enzimas aisladas. El ciclo redox de las *o*-naftoquinonas catalizado por la flavoenzima NADPH-P450 reductasa microsomal, debido a la inserción de la enzima en la membrana del retículo endoplásmico, no tiene acceso al citocromo P450 impidiendo asi su destrucción por radicales libres. La mayoría de las *o*-naftoquinonas ensayadas son potentes inhibidoras del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas seymouri*, a concentraciones del orden de 0.1-10 μM. Su acción implica la operación de reacciones redox. La inicial de reducción de la quinona a quinol (hidroquinona), es seguida por la oxidación del quinol por oxígeno molecular. La oxidación del quinol genera radicales semi-quinona, superóxido y peróxido de hidrógeno capaces de generar el radical hidroxilo, notable por su citotoxicidad. Como consecuencia de esas reacciones se produce un "daño oxidativo", que en los protozoarios estudiados se manifiesta por la disminución

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

* Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina (UBA/CONICET), Paraguay 2155, Buenos Aires (1121), Argentina.
Tel./fax: (541) 961-6521. E-mail: stoppani@mail.retina.ar

** Istituto Superiore di Sanità, Roma.

*** Cátedra de Química Cuántica, Facultad de Química. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
E-mail: marfot@bilbo.edu.uy

del ATP celular como resultado de la inhibición de la fosforilación oxidativa. También se produce disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas celulares. Al mismo tiempo, las quinonas aumentan la degradación fisiológica de las mismas moléculas. Resultados similares se obtuvieron con naftoquinona-iminas. Los grupos carbonilos vecinos y el anillo pirano son estructuras esenciales para la acción citotóxica de las quinonas. Estos efectos se discuten en relación a posibles usos farmacológicos de las naftoquinonas lipofílicas.

## ABSTRACT

Several lipophilic *o*-naphthoquinones, earlier suggested as trypanocidal agents, have proved to be effective inhibitors of tumor cell growth. These effects have renewed the interest on those quinones. Accordingly, in the present review we examine some relevant features of typical lipophilic *o*-naphthoquinones, namely, β-lapachone, structurally related molecules and mansonones. These quinones are highly reactive with complex enzymatic systems, either from animal origin, like the NADPH-P450 microsomal system, with trypanosomatids or with isolated enzymes. Quinone redox-cycling catalyzed by the microsomal NADPH-P450 system also generated oxygen radicals but the characteristic insertion of the flavoenzyme in the endoplasmic reticulum membrane prevent the accesibility of the "reactive oxygen species" to cytochrome P450 and accordingly the latter is conserved. As exemplified by β-lapachone and its likes, assayed *o*-naphthoquinones produce inhibition of trypanosomatids growth (*Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* and *Leptomonas seymouri*), with half-maximal inhibitory concentrations of about 0.1-10 μM. The cytotoxic effects imply quinone redox-cycling, with an initial reduction phase, that yields the quinol (hydroquinone), followed by the quinol oxidation by molecular oxygen. The quinol oxidation produces the semiquinone, superoxide radicals and hydrogen peroxide. These reactive species generate the highly cytotoxic hydroxyl radical. As result of the oxidative stress, oxidative phosphorylation is inhibited, as evidenced by the decrease of intracellular ATP. DNA, RNA and protein synthesis are also inhibited. Furthermore, β-lapachone, increases the rate of macromolecules degradation. Similar results were obtained with several quinone-imines. Presence of vicine carbonyl groups and the pyran ring are essential for *o*-naphthoquinone cytotoxity activity, as shown by the lesser effect of α–lapachone and mansonones A and C. The summarized effects are discussed considering the possible therapeutic use of *o*-naphthoquinones.

## INTRODUCCION

Las naftoquinonas son moléculas de gran importancia biológica pues se encuentran en todas las células aerófilas donde cumplen funciones específicas. Algunas naftoquinonas como las mitomicinas, son citotóxicas y tienen utilidad terapéutica; otras, como las vitaminas K, tienen función fisiológica[1-8]. Son moléculas muy reactivas, especialmente por su capacidad para reacciones de óxido-reducción (reacciones "redox"). En contraste con la abundante información existente sobre las propiedades, actividad y aplicaciones de las *p*-quinonas, las *o*-quinonas han sido menos estudiadas. Sin embargo, investigaciones recientes han puesto de manifiesto la acción de algunas *o*-naftoquinonas sobre células tumorales[9-12], lo que ha motivado renovado interés por las mismas. Ese interés justifica esta presentación.

Entre las *o*-quinonas con actividad citotóxica se encuentran la β-lapachona, sus análogos y las mansononas. La β-lapachona (Figura 1) fue aislada de la madera de lapacho (*Tabebuia avellanedae*), por Gonçalves de Lima y colaboradores[13-16]. Esos investigadores determinaron la estructura, las propiedades químicas y la actividad biológica (α- y β-lapachona). Entre las activi-

dades biológicas de la β-lapachona se observó la inhibición del crecimiento de bacterias, de tripanosomatídeos (*Trypanosoma cruzi*), de fibroblastos y de células de sarcomas. En contraste con la β-lapachona, su isómero, la *p*-quinona α-lapachona, resultó mucho menos activa. Esas observaciones fueron confirmadas y extendidas por numerosos investigadores de las Universidades de Río de Janeiro y de Buenos Aires[17-24], que comprobaron la capacidad de la β-lapachona para generar radicales libres del oxígeno (oxi-radicales) en presencia de oxígeno y reductores biológicos adecuados. Según las observaciones citadas, esos radicales podrían ser los responsables de la acción citotóxica de la β-lapachona. Estudios mas recientes[24] sobre la citotoxicidad de la β-lapachona demostraron que en el *T. cruzi*, esa quinona inhibe la síntesis de DNA, RNA y proteínas mientras que, al mismo tiempo acelera el recambio ("turnover") de macromoléculas. A pesar de la importancia de las observaciones citadas, la literatura no registra ensayos clínicos con la β-lapachona. Efectos "no deseados" de la β-lapachona podrían resultar de la producción de oxi-radicales o del desvío de electrones al oxígeno molecular, lo que afectaría procesos fisiológicos esenciales en el organismo huésped. La inhibición de la lipoperoxidación microsomal hepática constituye una expresión significativa de la actividad redox de la β-lapachona y quinonas similares en células animales[25,26].

En los últimos años, el interés por la β-lapachona se ha orientado hacia la búsqueda de efectos citostáticos, especialmente en el cáncer de próstata y en las leucemias[9-12]. En ese contexto, se han realizado importantes investigaciones sobre modificaciones de los mecanismos moleculares de la mitosis[27], que permiten caracterizar a la β-lapachona como un inhibidor potente de la división celular. Se han observado también efectos letales sobre virus[28,29] lo que extiende las perspectivas terapéuticas de la β-lapachona. Según los estudios mas recientes, la β-lapachona inhibe reacciones enzimáticas esenciales para la conservación del genoma. Así, a) inhibe la

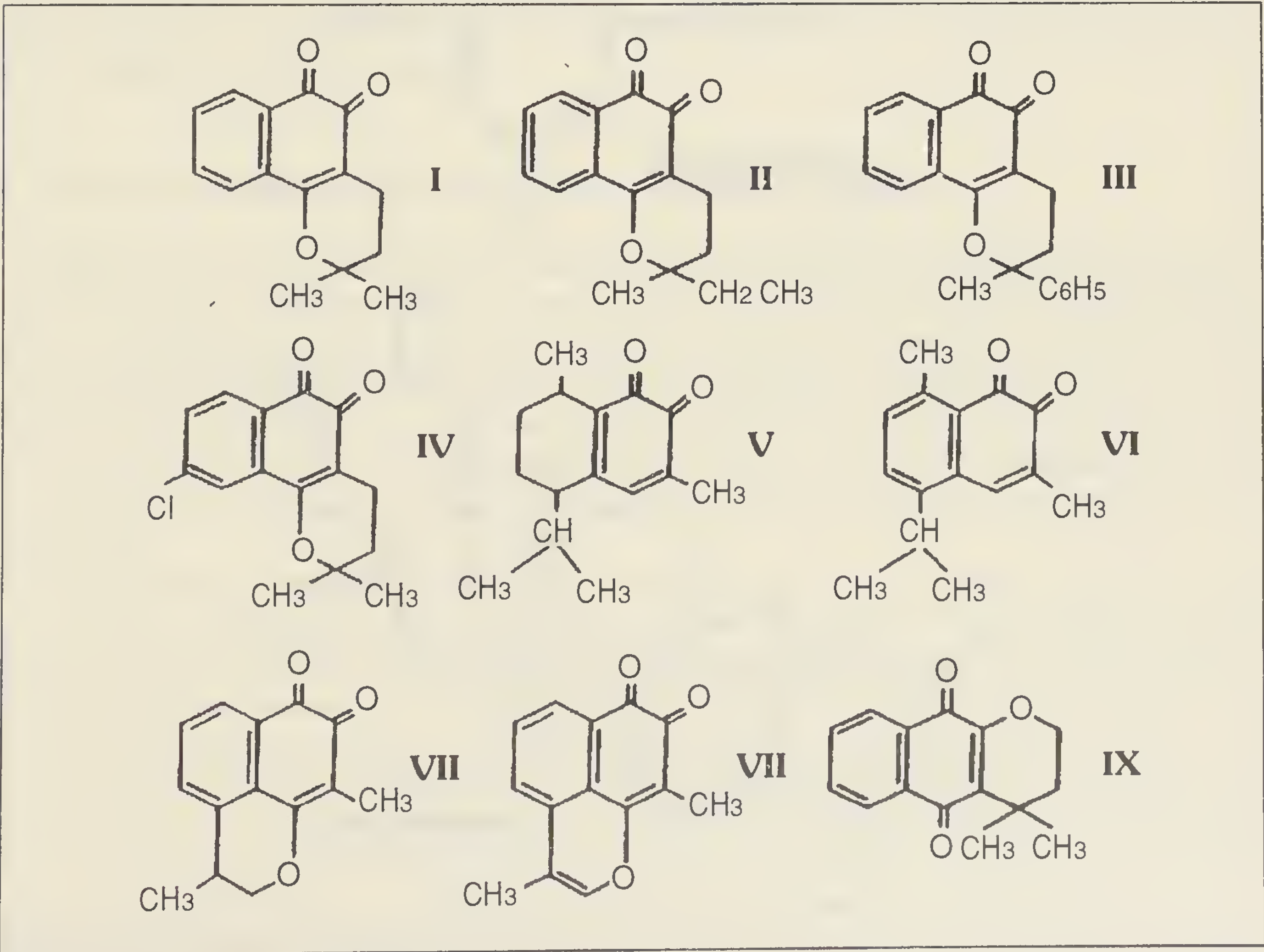



**Figura 1:** Estructura de naftoquinonas. I, ß-lapachona; II, CG 8-935; III, CG 9-442; IV, CG 10-248; V, mansonona A; VI, mansonona C; VII, mansonona E; VIII, mansonona F; IX, α-lapachona.

transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina[28]; b) inhibe la transcripción del virus de HIV(I)[29]; c) induce apoptosis de células de epiteliomas humanos[11]; d) induce apoptosis prescindiendo de la expresión del gen p53[27]; e) induce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromatides en células de tumor de ovario[27]; f) activa o inhibe la topoisomerasa I, según las condiciones experimentales[9,10,27]; g) forma complejos con proteínas, capaces de romper el ADN[27]; h) es un inhibidor potente de la reparación del ADN[30,31]; i) inhibe e induce roturas en el ADN ligado a proteínas[31]. Esas acciones no implicarían la intervención de oxi-radicales, lo que constituiría una novedad respecto a propuestas anteriores sobre el mecanismo de acción de las *o*-naftoquinonas. Por sus efectos, la β-lapachona se diferencia claramente de la *p*-quinona α-lapachona y del lapachol, moléculas mucho menos activas en la acción sobre sistemas biológicos[14,18,19,32-35].

Los efectos observados con la β-lapachona, han motivado la búsqueda de moléculas similares por síntesis o por extracción de vegetales. Así, Saba–Schaffner y asociados[28] sintetizaron varias *o*-naftoquinonas (en adelante, quinonas CG) caracterizadas por la presencia de grupos específicos en la posición 2 del anillo pirano o en las posiciones 8 y 9 del anillo naftaleno (Figura 1). Esas quinonas fueron ensayadas por los autores citados sobre la DNA polimerasa *in vitro* y también en ratones infectados con el virus de la leucemia de Rauscher. Se observaron buenas actividades sobre la DNA polimerasa, *in vivo,* con la quinona CG 9-442. En otras investigaciones, las mismas quinonas CG inhibieron activamente el crecimiento de los protozoarios *Crithi-*

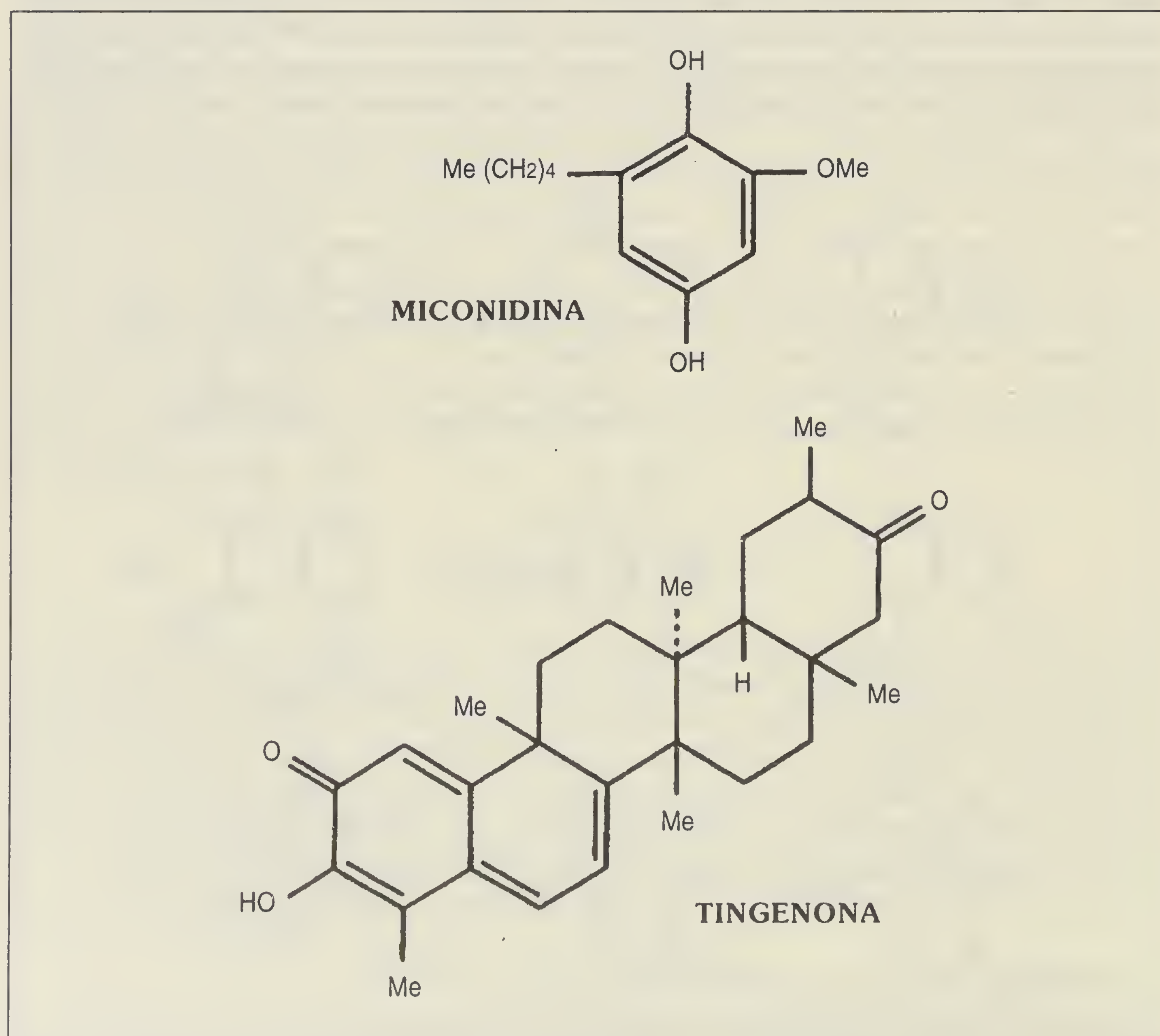



**Figura 2:** Estructura de la tingenoma y la miconidina.

*dia fasciculata, Leptomonas seymouri* y *T. cruzi*[34,35]. Además, inhibieron la peroxidación de lípidos en microsomas de hígado de rata, en la misma forma que la β-lapachona[25].

La investigación de los extractos de ciertas especies vegetales permitió a Marini-Bettolo y asociados[36-38] el aislamiento de nuevas *o*-naftoquinonas de la madera del árbol *Mansonia altissima,* quinonas que por su origen fueron denominadas mansononas[36]. Estas *o*-naftoquinonas difieren de la β-lapachona por la posición del anillo pirano en 1,8bc, en contraste con la posición 1,2b, en la β-lapachona (Figura 1). Las mansononas E y F resultaron inhibidores potentes del crecimiento de *Crithidia fasciculata* y de *L. seymouri*[34,35]. Las mismas mansononas generaron oxi-radicales catalizando reacciones redox, con reductores químicos, como el ascorbato[26] y la dihidrolipoamida[39], o biológicos como los contenidos por los organismos citados. Con preparaciones de origen animal (microsomas de hígado), las mansononas E y F inhibieron la producción de lipoperóxidos, como la β-lapachona y las quinonas CG[26]. En cambio, las mansononas A y C, carentes del ciclo pirano, fueron mucho menos activas, demostrando así la importancia del pirano para la actividad biológica. La citotoxicidad de las quinonas CG y de las mansononas E y F correlacionó positivamente con su capacidad para formar oxi-radicales[34,35,39].

Las *o*-quinona-iminas son, como la β-lapachona, moléculas capaces de producir oxi-radicales por ciclo redox[40,41]. Inhiben el crecimiento y la síntesis de las macromoléculas del *T. cruzi,* pero son menos activas que la β-lapachona. Tienen acción antichagásica *in vivo,* demostrable en ratones inoculados con *T. cruzi* [42] y acción antibacteriana *in vitro*[43]. Otras quinonas de estructura compleja, con actividad biológica manifiesta, son la horminona, la vismiona, la abruquinona y la ferruginona. Sin embargo, estas quinonas fueron menos activas que la tingenona, una triterpenilbenzoquinona, aislada de celastraceas e hypoceas. La tingenona[44,45] (Figura 2) forma aductos con el ADN por medio de puentes de hidrógeno entre sus grupo hidroxilo y los fosfatos del ADN. En esa forma, la tingenona puede afectar la síntesis de ADN *in vivo.* La Figura 2 muestra la estructura de la tingenona, conjuntamente con la de la miconidina, un quinol activo, también de origen vegetal.

## 1. Efecto de *o*-naftoquinonas sobre el sistema microsomal hepático

Según su estructura, las quinonas pueden afectar la peroxidación lipídica ("lipoperoxidación") de varias maneras. Algunas antraquinonas, facilitan la formación de lipoperóxidos, proceso dependiente de la producción de oxi-radicales, como consecuencia del ciclo redox de esas quinonas. En cambio, otras quinonas, como la menadiona y la ubiquinona inhiben la lipoperoxidación, o sea que se comportan como antioxidantes. El efecto antioxidante se puede explicar por el desvío de electrones a la quinona, con producción de semiquinona, que posteriormente transfiere el electrón no-apareado al oxígeno molecular, con producción de superóxido.

La β-lapachona, las quinonas CG y las mansononas tienen acciones características[25,26] sobre sistemas constituídos por microsomas de hígado, NADPH, ADP y Fe(III), a saber: a) inhibición de la producción de lipoperóxidos, representado por la formación del malondialdehido; b) inhibición de la destrucción del citocromo P450, resultante de la producción de lipoperóxidos; c) inhibición de las reacciones microsomales dependientes del citocromo P450, como la hidroxilación de la anilina, la demetilación de la antipirina, y la de-etilación de la 7-etoxicumarina; d) estímulo de la oxidación del NADPH y producción de anión superóxido; e) estímulo de la reducción del sistema ADP/Fe(III) por microsomas hepáticos suplementados con NADPH; f) producción del radical libre semiquinona, demostrada por ESR, como consecuencia de la acción de reductores metabólicos, en anaerobiosis. Las *p*-naftoquinonas α-lapachona y menadiona fueron siempre menos activas que la β-lapachona y sus análogos las quinonas CG[25,26]. Las mansononas C, E y F fueron en general activas, como las quinonas CG pero la mansonona A

fue poco activa, lo que se puede atribuir a la estructura tetralina de su núcleo naftaleno, en el que la aromaticidad está limitada a un solo anillo.

Las observaciones descriptas[25,26] concuerdan con la operación del ciclo redox de las quinonas catalizado por la enzima NADPH-P450 reductasa, una flavoenzima específica. Como resultado de esa acción catalítica se forma superóxido y peróxido de hidrógeno (ver Sección 7) capaces de producir por la reacción de Fenton, la destrucción del citocromo P450 y la inhibición de las reacciones de hidroxilación que cataliza ese citocromo. La no-producción de esos efectos con el sistema quinona-microsomas-NADPH-ADP-Fe(III)[25,26] concuerda con la inserción especial de la NADPH-P450 reductasa en la membrana del retículo endoplasmático. La enzima, está fijada a la membrana por un corto segmento hidrofóbico de manera tal que el segmento catalítico, donde se encuentra el centro activo de la misma, es independiente y los radicales libres allí formados no tienen acceso a la membrana. El sector catalítico puede entonces interactuar con la quinona en la fase acuosa, lejos de la fase lipídica de la membrana donde se encuentran las cadenas alifáticas de los ácidos grasos y las moléculas proteicas correspondientes a las enzimas del retículo endoplásmico. Los radicales hidroxilo, resultantes de la reacción de Haber-Weiss, por su alta reactividad no sobreviven a colisiones después de su formación.

## 2. Efecto de *o*-quinonas sobre tripanosomatídeos

La producción de oxi-radicales como el anión superóxido, precursor del peróxido de hidrógeno y del muy tóxico radical hidroxilo[17-26], confiere a las quinonas una citotoxicidad que se comprueba fácilmente con tripanosomatídeos como *T. cruzi* (patógeno para el hombre), *C. fasciculata* y *L. seymouri* (no patógenos para el hombre). Estos últimos protozoarios han sido recomendados para el ensayo de drogas potencialmente útiles como agentes tripanocidas[46,47].

**TABLA 1**
Acción citotóxica de quinonas sobre el crecimiento de *Leptomonas seymouri* y *Crithidia fasciculata*

| Quinona | Concentración inhibidora 50% del crecimiento del parásito (μM) | |
|---|---|---|
| | *L. seymouri* | *C. fasciculata* |
| ß-Lapachona | 0,4 | — |
| α-Lapachona | 4,1 | 27 |
| CG 8-935 | 0,3 | 0,8 |
| CG 9-442 | 0,7 | 0,7 |
| CG 10-248 | 0,4 | 0,8 |
| Mansonona A | 8,5 | 15,0 |
| Mansonona C | 4,0 | 6,0 |
| Mansonona E | 0,4 | 0,6 |
| Mansonona F | 0,1 | 0,3 |
| Naftoquinona-imina (QIVD) | 0,8 | 5,5 |
| Naftoquinona-imina (QIIIE) | 1,5 | 26,0 |

Las quinonas se ensayaron sobre cultivos de los organismos indicados en las condiciones experimentales descriptas en las Referencias [34, 35, 39-41].

La Figura 3 muestra los efectos de la quinona CG 9-442 sobre el crecimiento del *T. cruzi*. Se puede ver que el efecto de la quinona fue proporcional a su concentración. La Tabla 1 reseña los efectos de las diferentes quinonas ensayadas sobre el crecimiento de *L. seymouri* y *C. fasciculata*. Quinonas como las CG, la β-lapachona, las quinona-iminas y las mansononas E y F fueron inhibidoras potentes del crecimiento de los organismos ensayados, mientras que la α-lapachona y las mansononas A y C fueron menos activas. Otras quinonas, como la miconidina, la 1,4-metoxi-taxodiona, la horminona, la tingenona, la abruquinonas A y B, la feruginina B y la vismiona A mostraron diferentes actividades[44,45] sobre el crecimiento del *T. cruzi* in vitro. La miconidina, la 1,4-metoxitaxodiona, la horminona, la tingenona y la abruquinona A inhibieron el crecimiento del parásito con potencia decreciente en el orden indicado, mientras que la vismiona y la ferruginina B lo afectaron escasamente o no lo inhibieron.

## 3. Efecto de las lapachonas sobre la síntesis y la degradación de macromoléculas

Los efectos de las *o*-naftoquinonas sobre el crecimiento de tripanosomatídeos implican modificaciones de la síntesis y degradación de las macromoléculas del parásito, en particular, ADN, ARN y proteínas. El efecto de la β-lapachona sobre la síntesis de esas macromoléculas se demostró por su inhibición de la incorporación de precursores marcados a saber, [$^3$H]-timidina (ADN), [$^3$H]-uridina (ARN), [$^3$H]-leucina (proteínas)[24,44,45]. En un experimento típico con *T. cruzi* [24], se pudo observar que la β-lapachona disminuyó la incorporación de los tres precursores en función del tiempo de incubación y de la concentración de quinona (Tabla 2). Con la [$^3$H]-uridina, la cinética de incorporación fue bifásica, con un período inicial de crecimiento (síntesis de ARN), seguido por otro en disminución (destrucción del ARN), causado por la qui-

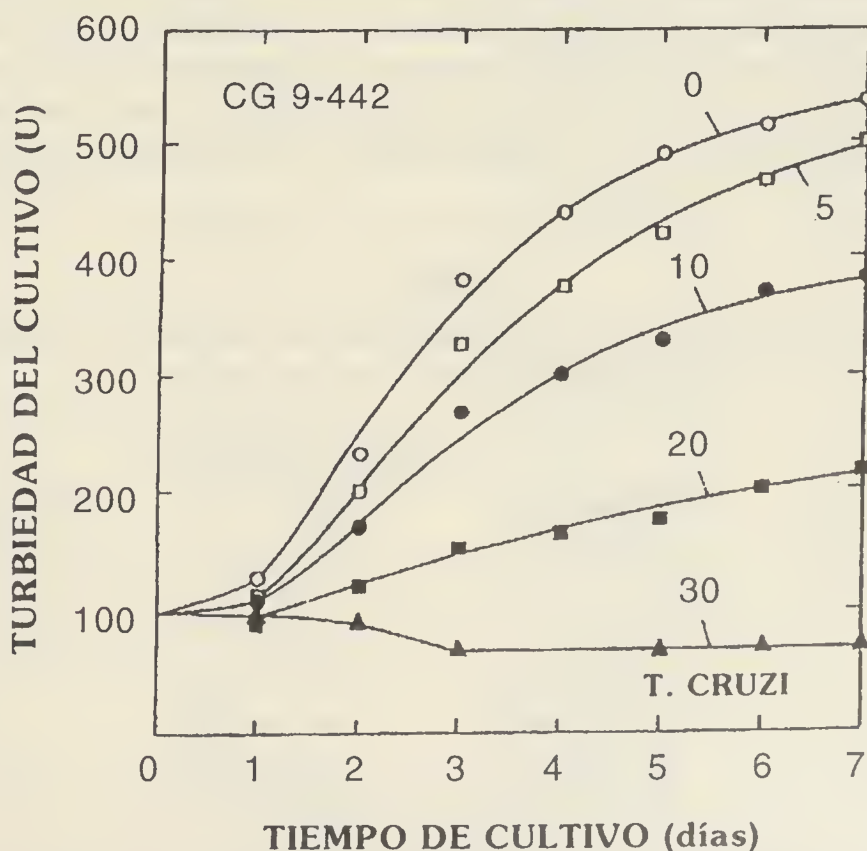



**Figura 3.** Efecto de CG 9-442 sobre el crecimiento del *Trypanosoma cruzi*. Condiciones experimentales según la Referencia 34. Los números sobre las líneas indican la concentración de quinona (μM). La turbiedad es proporcional al número de células.

nona. También la miconidina y la tingenona inhibieron la incorporación de todos los precursores[44,45] pero con modalidades diferentes pues con la primera, la mayor inhibición se obtuvo con L-[$^3$H]leucina y la menor con [$^3$H]timidina, mientras que la tingenona inhibió con igual intensidad las incorporaciones de [$^3$H]timidina y [$^3$H]uridina, y en grado algo mayor, la de L-[$^3$H]leucina. En todos los casos la miconidina fue más efectiva que la tingenona. Un efecto característico de la miconidina fue la disminución, en valores absolutos, de la [$^3$H]uridina incorporada, tres horas después de incubar con el inhibidor. Con la miconidina y la tingenona, las concentraciones inhibidoras 50% ($I_{50}$) del crecimiento, por una parte, y de la incorporación de precursores, por la otra, fueron coherentes.

El efecto de la β-lapachona sobre la degradación de las macromoléculas de *T. cruzi* [24] se investigó marcando esas moléculas con el precursor correspondiente y esos tripanosomas se incubaron con la quinona. En esas condiciones, la radioactividad decayó, por el recambio natural con las mismas moléculas no-radioactivas, según la cinética de recambio ("turnover") fisiológico. Ese recambio fue significativamente mayor en presencia de la β-lapachona, en proporción a la concentración de quinona. El daño bioquímico causado por la β-lapachona fue notable sobre el ADN y se expresó por el incremento en la "síntesis no-programada" del mismo, en la disminución del ADN nuclear, y en el aumento de la movilidad electroforética del ADN cinetoplástico.

## 4. Efecto de *o*-naftoquinonas sobre la fosforilación oxidativa

El ATP celular es parámetro muy sensible para caracterizar acciones citotóxicas. Los niveles de ATP y ADP en *C. fasciculata* y *T. cruzi*, en fase estacionaria de crecimiento, varían entre 15-40 nmol ATP y 3-7 nmol ADP/$10^8$ células[48]. La incubación de esos organismos con las *o*-quinonas CG 8-935, CG 9-442 y CG 10-248 produjo una disminución significativa del nivel de ATP, con variaciones no–significativas del nivel de ADP[48]. La cinética de la variación de ATP mostró una demora inicial de 1-2 horas de incubación y la disminución del nivel de ATP alcanzó su valor máximo al cabo de 4-6 horas. La adición de L-glutamato o D-glucosa como fuente de energía aumentó 2-3 veces el valor inicial de ATP, que alcanzó valor máximo después de 4-6 horas de incubación (Tabla 3). Las quinonas anularon o disminuyeron el efecto de la D-glu-

**TABLA 2**
Efecto de lapachonas sobre la incorporación de precursores radioactivos en macromoléculas de *Trypanosoma cruzi*

| Lapachona (µM) | Precursor molecular: [$^3$H]Timidina (ADN) | [$^3$H]Uridina (ARNs) | [$^3$H]Leucina (Proteínas) |
|---|---|---|---|
| 0 (Testigo) | 100 ± 10 | 100 ± 8 | 100 ± 7 |
| ß, 1,6 | 32 ± 3 (68) | 44 ± 4 (56) | 75 ± 7 (25) |
| ß, 7,8 | 5 ± 3 (95) | 24 ± 4 (76) | 7 ± 2 (93) |
| α, 1,6 | 97 ± 8 (3) | 74 ± 8 (26) | 64 ± 8 (34) |
| α 7,8 | 41 ± 5 (59) | 60 ± 4 (40) | 12 ± 5 (88) |

Condiciones experimentales según la Referencia 24. Los resultados representan el promedio de tres determinaciones y se expresan como el porcentaje ± DE del valor de la muestra testigo sin lapachona (100%). Entre paréntesis inhibición %.

cosa y del L-glutamato. La *p*-quinona α-lapachona fue menos activa que las *o*-quinonas sobre los niveles de ATP en los organismos estudiados. Se debe concluir que directamente o por intermedio de "oxígeno activo", formado como consecuencia de ciclos redox, las drogas ensayadas produjeron una acción citotóxica expresada por una menor formación de ATP.

*T. cruzi* y *C. fasciculata* son organismos capaces de sintetizar ATP por el mecanismo de la oxidación fosforilante[48-56]. Ambos poseen un complejo quinetoplasto-mitocondria, en cuya membrana interna funciona una cadena respiratoria, un sistema fosforilante acoplado, constituido por citocromos tipo b, c, o y $aa_3$, y una F1F0-ATP sintasa mitocondrial. En las mitocondrias, el glutamato es oxidado, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, previa desaminación. Con la D-glucosa, el mecanismo de producción de ATP es mas complejo pues primero se formaría una pequeña cantidad de ATP como producto de la glucólisis anaeróbica. Después, la oxidación del piruvato resultante, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, completa la producción aeróbica de

**TABLA 3**

Efecto de CG 8-935 sobre niveles de ATP y ADP en *Crithidia fasciculata*. Influencia de L-glutamato y D-glucosa

| Adiciones | Nucleótido | Tiempo de incubación (h) | |
|---|---|---|---|
| | | 2 | 4 |
| Ninguna | ATP | 32,21 ± 1,18 | 30,73 ± 1,77 |
| | ADP | 4,98 ± 0,29 | 5,03 ± 0,89 |
| | ATP/ADP | 6,48 ± 0,43 | 6,12 ± 0,78 |
| CG 8-935 | ATP | 24,89 ± 0,89[c] | 25,61 ± 1,95[a] |
| | ADP | 5,00 ± 0,25 | 3,77 ± 0,09 |
| | ATP/ADP | 4,98 ± 0,34[a] | 6,72 ± 0,60 |
| L-Glutamato | ATP | 38,27 ± 1,71[d] | 73,52 ± 1,99[d] |
| | ADP | 6,70 ± 0,49 | 7,10 ± 0,30 |
| | ATP/ADP | 5,71 ± 0,65 | 10,35 ± 0,67[d] |
| L-Glutamato + CG 8-935 | ATP | 32,51 ± 0,94 | 50,82 ± 2,12[d] |
| | ADP | 6,91 ± 0,23 | 3,74 ± 0,38 |
| | ATP/ADP | 4,70 ± 0,34[d] | 8,85 ± 0,74 |
| D-Glucosa | ATP | 65,18 ± 1,70[d] | 84,36 ± 2,32[d] |
| | ADP | 7,05 ± 0,27 | 8,29 ± 0,35 |
| | ATP/ADP | 9,24 ± 0,58[c] | 10,18 ± 0,78[c] |
| D-Glucosa + CG 8-935 | ATP | 35,81 ± 0,71[c] | 24,36 ± 1,95[a] |
| | ADP | 5,36 ± 0,27 | 4,94 ± 0,19 |
| | ATP/ADP | 6,68 ± 0,29 | 4,93 ± 0,60[a] |

Condiciones experimentales según la Referencia 48. La concentración de las adiciones fue (mM): CG 8-935, 0,01; L-glutamato, 5,0; D-glucosa, 5,0. Los valores representan el promedio.

P: $^a < 0,05$; $^b < 0,02$; $^c < 0,01$; $^d < 0,01$.

ATP, varias veces superior a la anaeróbica. El efecto de las quinonas sobre los niveles de ATP y ADP se puede explicar suponiendo una menor síntesis de ATP (hipótesis de la menor síntesis). En efecto, una destrucción exagerada de ATP (hipótesis de la mayor destrucción) debería determinar un mayor nivel de ADP, paso obligado a la formación de AMP. El AMP es rápidamente desaminado lo que impide su re-fosforilación y por lo tanto su conversión en ATP. La hipótesis de la mayor destrucción requiere que la F1F0-ATP sintasa mitocondrial, principal generador de ATP en la célula, aumente su actividad hidrolítica latente, normalmente muy baja. En consecuencia, subsiste como hipótesis plausible la inhibición de la síntesis de ATP. Esa inhibición se puede explicar por el desvío de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial con disipación de la energía requerida para la síntesis de ATP, y/o por inhibición de la ATP-sintasa por oxi-radicales.

La inhibición de la fosforilación oxidativa por las quinonas, con glutámico como sustrato, implica una posible acción directa sobre las membranas mitocondriales de los tripanosomatídeos estudiados. Esa acción podría consistir en una inactivación del sistema fosforilante por oxi-radicales generados por el ciclo redox de las quinonas. Esta hipótesis concuerda con la producción de radical superóxido por membranas mitocondriales de *C. fasciculata*[56]. En efecto, membranas de *C. fasciculata* en presencia de NADH y *o*-naftoquinonas lipofílicas catalizaron la producción de anión superóxido; la superóxido dismutasa inhibió esa formación. A concentración de quinona 10 µM, la actividad decreció según el orden mansonona E > CG 9-442 > CG 10-248 > mansonona F > mansonona C. Excepto la mansonona F, la actividad de las quinonas se correlacionó con su acción sobre el crecimiento de *C. fasciculata* in vitro. Las quinonas es-

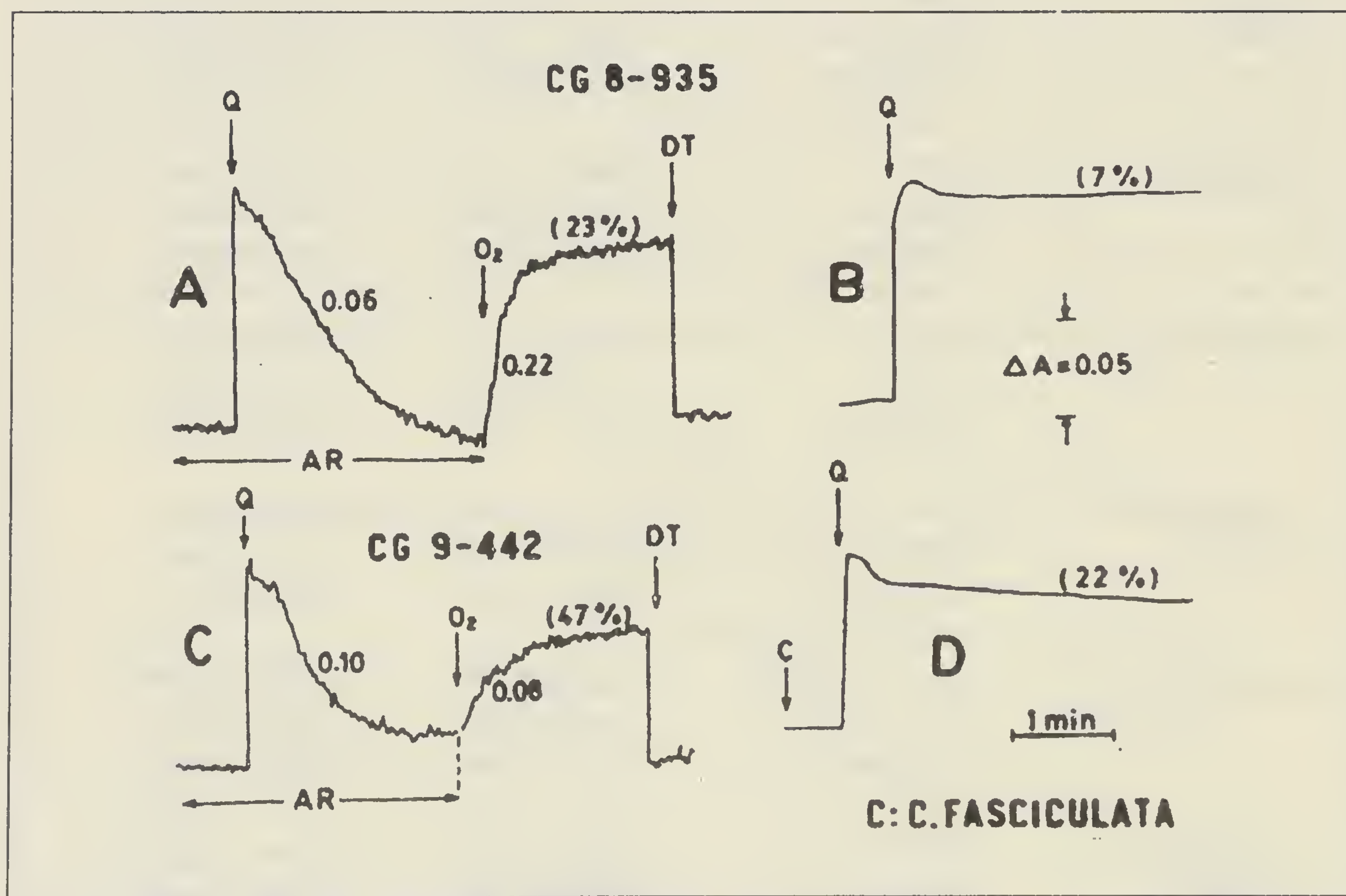



**Figura 4:** Ciclo redox de CG 8-935 y CG 9-442 en *Crithidia fasciculata*. Condiciones experimentales según la Referencia 35. Experimentos A y C. La solución de quinona (Q) se mezcló con el medio de reacción gaseado con argón (AR) en cubeta anaeróbica y se midió la absorbancia. Después de la reducción de la quinona, se oxigenó la suspensión ($O_2$) y se midió la variación de absorbancia. La adición de ditionito (DT), redujo nuevamente la quinona. En los experimentos B y D, se omitió el gaseado con AR. Los números indican velocidad de reducción (u oxidación) de la quinona. Entre paréntesis, porcentaje de quinona reducida en el estado estacionario. C, células.

timularon el consumo de oxígeno por las membranas mitocondriales en presencia de NADH, pero no de succinato como dador de electrones[56]. Con NADH, el estímulo de la actividad oxidativa decreció en el orden CG 10-248 > CG 9-442 > mansonona E > mansonona F > mansonona C > mansonona A. Se puede postular como mecanismo de producción de superóxido, la catálisis del ciclo redox de las quinonas por flavoenzimas del Sitio I de la cadena respiratoria mitocondrial (NADH-deshidrogenasa y NADH-fumarato reductasa), dado que el fumarato inhibe esa producción mientras que el succinato no la estimula ni la inhibe[56].

## 5. Ciclo redox de las *o*-naftoquinonas

El ciclo redox de las quinonas en los tripanosomatídeos estudiados fue fácilmente reconocible por las variaciones de absorbancia de las mismas, en presencia de células capaces de consumir oxígeno. La Figura 4 muestra el ciclo redox de las quinonas CG 9-442 y CG 8-935 en *C. fasciculata*. En los experimentos A y C, las quinonas se añadieron a las células en un medio que contenía glucosa, glucosa oxidasa y catalasa, gaseado con argón, condiciones que aseguraron la ausencia de oxígeno. La adición de quinona produjo un aumento instantáneo de absorbancia, seguido por una disminución rápida, reveladora de la reducción biológica de la quinona (fase anaeróbica del ciclo redox). Cuando la reducción alcanzó su grado máximo, se oxigenó la suspensión y como consecuencia de ello el quinol se oxidó (fase aeróbica del ciclo redox) hasta alcanzar un estado estacionario en el que la relación [quinol]/[quinona] correspondió al 23% (o

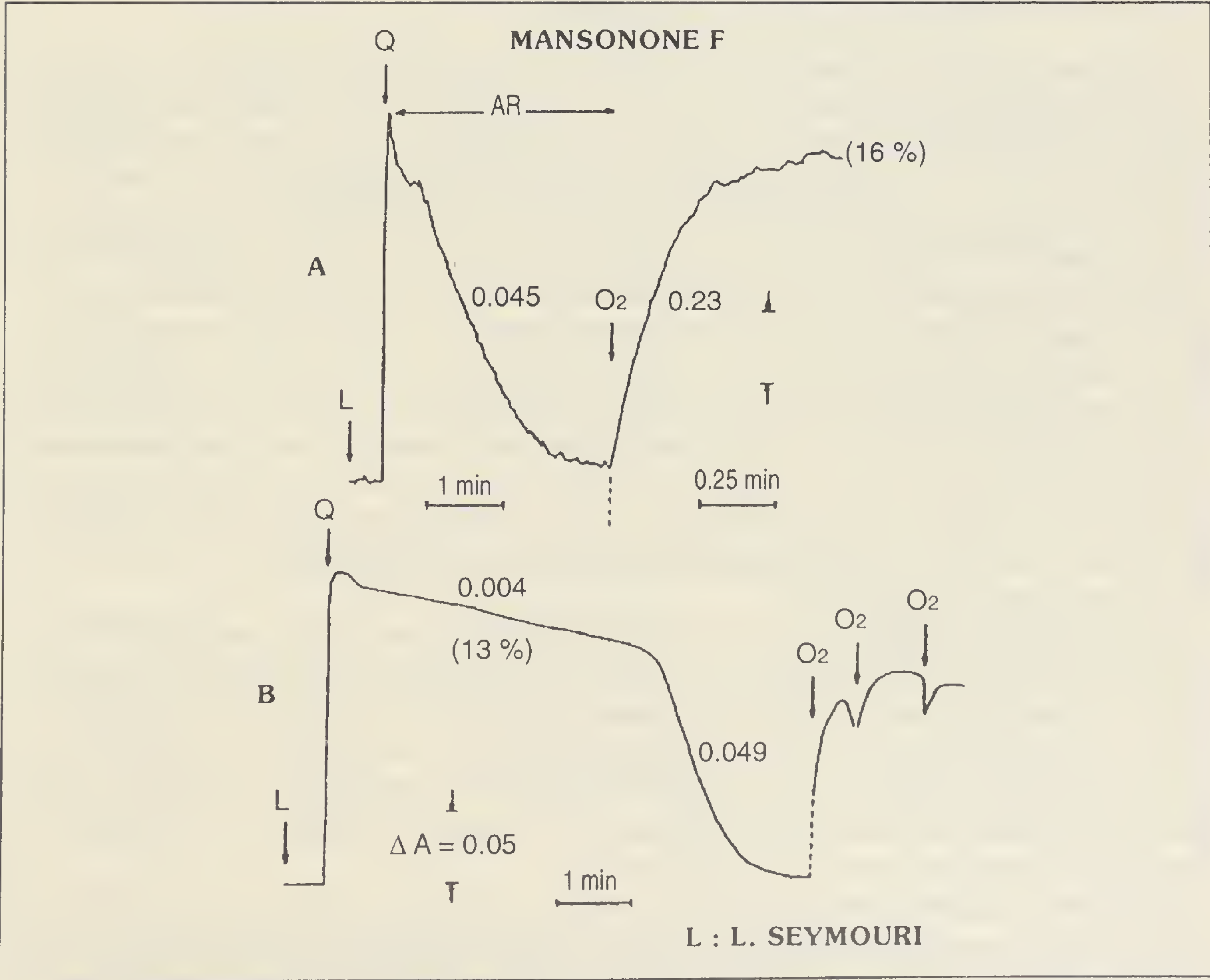



**Figura 5:** Ciclo redox de la mansonona F en *Leptomonas seymouri*. Condiciones experimentales según la Referencia 35. A: experimento anaeróbico; B: experimento aeróbico.

al 47%) del total de CG 8-935 (o de CG 9-442). Por último, la adición de ditionito produjo la reducción total de la quinona, confirmando así la operación del ciclo redox. En los experimentos B y D se omitió la fase anaeróbica y los trazados muestran que después del aumento inicial de absorbancia, la disminución de la misma fue limitada. En consecuencia, la relación [quinol]/[quinona] correspondió a una concentración de quinol equivalente al 7% (exp. B) o al 22% (exp. D) de la quinona inicial. La menor concentración de quinol en los experimentos B y D respecto a la observada en la fase aeróbica de los experimentos A y C concuerda con la producción de un estado estacionario en el que la quinona se encuentra parcialmente reducida. Con la mansonona E y *L. seymouri,* la velocidad de oxidación del quinol superó la de reducción de la quinona. En el experimento aeróbico, el estado estacionario se alcanzó con una concentración de quinol equivalente al 4% de la quinona inicial, valor menor que el obtenido con las quinonas CG (resultado omitido), lo que resulta de la mayor velocidad de oxidación del quinol. Resultados similares se obtuvieron con la mansonona F (Figura 5) pero con esta quinona, la oxidación del quinol fue más lenta que con la mansonona E, como lo demuestra la necesidad de varias adiciones de oxígeno para alcanzar el estado estacionario final (Figura 5). En contraste con los resultados obtenidos con las mansononas E y F, la oxidación de los quinoles de las mansononas A y C fue lenta, tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Las quinonas se pueden entonces clasificar en: a) quinonas con quinol de oxidación lenta (mansononas A y C); b) quinonas con quinoles de oxidación rápida (mansononas E y F; quinonas CG).

## 6. Efectos de las quinonas sobre producción de $H_2O_2$ y $O_2^-$

La incubación de *L. seymouri* y *C. fasciculata* con las mansononas CG determinó la liberación de $H_2O_2$ al medio de suspensión de las células, verificada por la formación del complejo $H_2O_2$ -microperoxidasa y por el efecto inhibidor de la catalasa. Con *L. seymouri* la máxima producción de $H_2O_2$ se obtuvo con CG 10-248, correspondiendo valores menores a las mansononas E y F. La adición de catalasa inhibió la formación del complejo $H_2O_2$ -microperoxidasa y más aún, con CG 10-248, la catalasa produjo la descomposición del complejo preformado. Con *L. seymouri* y mansonona F, la velocidad de formación de $O_2^-$ fue aproximadamente cinco veces mayor que la de $H_2O_2$, lo que concuerda con la función de $O_2^-$ como precursor del $H_2O_2$. La Tabla 4 muestra la producción de $H_2O_2$ y $O_2^-$ por *L. seymouri* y *C. fasciculata* en presencia de las quinonas más efectivas sobre el crecimiento de esos organismos, a saber, las mansononas E y F, las quinonas CG 8-935, CG 10-248 y la β-lapachona. Se puede ver que todas aumentaron la producción de $H_2O_2$ y $O_2^-$ pero con *C. fasciculata,* el efecto de las quinonas CG sobre la producción de $H_2O_2$ superó al de las mansononas E y F. Esa diferencia no se manifestó en la producción de $O_2^-$. El efecto de las quinonas fue proporcional a su concentración, si bien con cinéticas distintas para el $H_2O_2$ y $O_2^-$.

Varias aminoisoxazolil-1,2-naftoquinonas (quinona-iminas) también estimularon la formación de $O_2^-$ y $H_2O_2$ por *C. fasciculata* y *T. cruzi*[40,41]. Los compuestos (N-(5-metil-3-isoxazolil)-4-amino-1,2-naftoquinona; (2-hidroxi-N-(5-metil-3-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina) y (2-hidroxi-N-(3-metil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina) estimularon la producción de $H_2O_2$ mientras que (2-hidroxi-N-(3,5-dimetil-4-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina) y (2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona-4-imina), estimularon la formación de anión superóxido en los organismos estudiados.

El contenido de catalasa en *C. fasciculata* fue 5 veces mayor que el de *L. Seymouri.* A pesar de esas diferencias, a) las velocidades de producción de $H_2O_2$ generada por las quinonas fue similar para ambos organismos (Tabla 4) y b) las quinonas fueron igualmente tóxicas para *C. fasciculata y L. seymouri* (Tabla 1). Parecería entonces que en los organismos ensayados la catalasa no desempeñaría una función protectora contra $H_2O_2$. Esta hipótesis concuerda con la no-

ción que en los tripanosomatídeos, la catalasa actuaría esencialmente como un reservorio de hemo. La inhibición de la catalasa y la inactivación de la superóxido dismutasa por el $O_2^-$ y el $H_2O_2$, respectivamente[57-60], favorecería la producción de oxi-radicales, lo que significa que varios mecanismos podrían ejercer efectos concordantes.

La producción de $H_2O_2$ por *T. cruzi*, *C. fasciculata* y *L. seymouri* en presencia de *o*-naftoquinonas concuerda con la intervención de oxi-radicales en la toxicidad de las mismas. En efecto, la toxicidad del $H_2O_2$ se ha demostrado con organismos pro- y eucariotes, a saber, plasmidos, *Escherichia coli*, *Entamoeba histolytica*, levaduras, fibroblastos, hepatocitos, etc.[61-63]. Las lesiones bioquímicas incluyen roturas en el ADN; intercambio de cromatidas; alteraciones en la membrana celular; depleción de tioles[64-66]; pérdida de la capacidad proliferativa; destrucción de la superóxido dismutasa, la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y la ATP-sintasa[56]. Esas lesiones se pueden producir con concentraciones bajas de $H_2O_2$ y se exageran en presencia de $O_2^-$, dos condiciones compatibles con las observadas durante la incubación de los tripanosomatídeos con las *o*-naftoquinonas. Entre otras acciones, el $O_2^-$ inhibe la catalasa, lo que favorece la reacción de Fenton. En presencia de Fe(II), el $H_2O_2$ se descompone según esa reacción ($H_2O_2$ + Fe(II) → Fe(III) + OH· + OH·) produciendo el radical hidróxilo, muy tóxico. Por otra parte, el $O_2^-$ formado por oxidación de los quinoles completa la reacción de Haber-Weiss pues el $O_2^-$ reduce el Fe(III) a Fe(II). El $O_2^-$ es un generador de $H_2O_2$ (reacción de la superóxido dismutasa) lo que contribuye a la operación de la reacción de Haber-Weiss como fuente de OH·.

**TABLA 4**
Producción de $H_2O_2$ y $O_2^-$ por *L. seymouri* y *Crithidia fasciculata*

| Quinona | *L. seymouri* | *C. fasciculata* |
|---|---|---|
| | Producción de $H_2O_2$ (nmol/min/mg de proteína)· | |
| Mansonona E | 0,43 ± 0,02 (2) | 0,48 ± 0,04 (11) |
| Mansonona F | 0,23 ± 0,05 (5) | 0,30 ± 0,14 (2) |
| CG 8-935 | 0,35 ± 0,08 (4) | 1,04 ± 0,04 (3) |
| CG 10-248 | 0,65 ± 0,02 (9) | 1,54 ± 0,34 (4) |
| ß-Lapachona | 0,47 ± 0,12 (4) | 0,43 ± 0,04 (8) |
| Ninguna | ND | ND |
| | Producción de $O_2^-$ (nmol/min/mg de proteína)· | |
| Mansonona E | 1,80 ± 0,05 (5) | 2,20 ± 0,20 (2) |
| Mansonona F | 2,03 ± 0,43 (5) | 1,84 ± 0,10 (2) |
| CG 8-935 | 1,88 ± 0,82 (4) | 1,72 ± 0,51 (4) |
| CG 10-248 | 1,08 ± 0,03 (8) | 5,20 ± 0,57 (4) |
| ß-Lapachona | — | 1,22 ± 0,01 (2) |
| Ninguna | ND | ND |

Condiciones experimentales según Referencias 34 y 35. ND, no detectada.
* Promedio ± DE o desvío del valor medio (determinaciones en duplicado). Entre paréntesis, número de determinaciones.

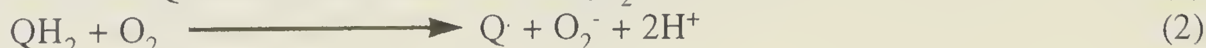
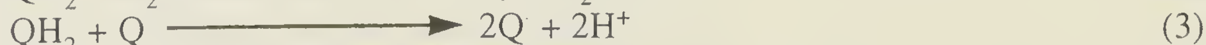
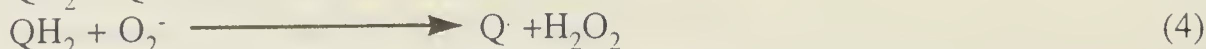
## 7. Mecanismo de las reacciones redox de las *o*-naftoquinonas

Las quinonas aceptan electrones, uno o dos según la naturaleza del dador y el mecanismo de la reacción redox. La reducción enzimática por transferencia de un electrón produce la semiquinona (radical libre), que no se fija al centro activo de la quinona-reductasa. Numerosas enzimas de mamífero catalizan esta reacción, a saber, la NADPH-citocromo P450 reductasa, la NADH citocromo b5 reductasa, la NADPH-ubiquinona oxido reductasa y la tioredoxina reductasa. Cuando la semiquinona se fija al centro activo de la enzima, puede ser reducida por un hidruro proveniente del reductor (por ejemplo NAD(P)H), reacción catalizada por la misma quinona-reductasa. En esos casos se produce la hidroquinona, con transferencia de dos electrones del reductor a la quinona. Las reacciones de transferencia de dos electrones son catalizadas por flavoproteínas denominadas diaforasas, como la enzima citosólica del hígado de rata. Por otra parte, las semiquinonas pueden ser generadas por reacciones no-enzimáticas, a saber, a) dismutación de la quinona y el quinol; b) la oxidación de la hidroquinona por el oxígeno; c) la reducción de la quinona por el anión superóxido ($O_2^-$), radiólisis y reacción de la quinona-triplete con reductores adecuados. La oxidación de semiquinonas e hidroquinonas, produce radicales libres del oxígeno. El producto primario de la oxidación de la semiquinona por el oxígeno es el anión superóxido, pero otras moléculas (los citocromos c, b5, la metahemoglobina o una unión covalente en el ADN) pueden actuar como aceptores del electrón libre de la semiquinona. El mecanismo de esas reacciones se analiza en la Referencia 39.

## 8. Reacciones de *o*-naftoquinonas con tioles

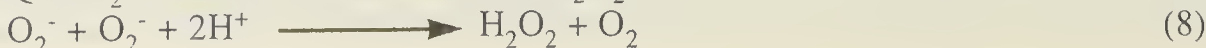
Estas reacciones tienen importancia farmacológica porque, por una parte contribuyen al ciclo redox de las quinonas y por la otra producen depleción de tioles libres en la célula (por ejemplo, el glutatión reducido). Un tipo especial de reacciones tiol-quinonas es la formación de aductos[3] pero esas reacciones no ocurren con la β-lapachona y análogos por lo que no serán consideradas.

A continuación se ilustra la secuencia de reacciones, tomando como ejemplo la oxidación de un reductor (el ditiol, la dihidrolipoamida, DHLA), por un oxidante (la β-lapachona). La DHLA es el sustrato de la enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa, constituyente de varios complejos enzimáticos con importante función en respiración celular. En primer lugar, la DHLA reduce a la quinona a hidroquinona (QH2) y al mismo tiempo se produce el disulfuro lipoamida (LA) (Reacción 1). La reacción procede en dos etapas, de un electrón por vez. En la primera, se forma el anión-radical disulfuro y anión-radical semiquinona. La segunda, produce el disulfuro y el quinol (la Reacción 1 representa la suma de las dos reacciones). La oxidación del quinol por el oxígeno, con formación de la semiquinona y superóxido (Reacción 2), la dismutación del sistema quinona/quinol (Reacción 3) contribuyen a la propagación del proceso lo mismo que las Reacciones 4 y 5. Reacciones 6-8 determinan la "terminación" de la cadena de reacciones.


$$DHLA + Q \longrightarrow LA + QH_2 \quad (1)$$

$$QH_2 + O_2 \longrightarrow Q^{\cdot} + O_2^- + 2H^+ \quad (2)$$

$$QH_2 + Q \longrightarrow 2Q^{\cdot} + 2H^+ \quad (3)$$

$$QH_2 + O_2^- \longrightarrow Q^{\cdot} + H_2O_2 \quad (4)$$

$$Q^{\bullet} + O_2 \longrightarrow Q + O_2^- \quad (5)$$

$$Q^{\bullet} + Q^- + 4H^+ \longrightarrow 2QH_2 \quad (6)$$

$$Q^{\bullet} + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow Q + H_2O_2 \quad (7)$$

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (8)$$

Las mismas reacciones tienen lugar con el glutatión reducido (GSH), que se oxida a disulfuro (glutatión oxidado o GSSG) o con otros tioles, por ejemplo la dihidrotripanotiona o los tioles ligados a proteínas. En el caso de las enzimas se produce la inactivación de las mismas[64-66].

## 9. Estructura electrónica y actividad biológica

Un procedimiento utilizado para correlacionar estructura electrónica y actividad química o biológica de moléculas es el tratamiento extratermodinámico. En ese método se considera que cada parte de la molécula ejerce una influencia específica sobre las constantes de equilibrio y la actividad química, debido a variaciones en la densidad electrónica, a efectos estéricos y/o lipofílicos. Entre los parámetros químico–cuánticos utilizados para caracterizar la estructura electrónica molecular se encuentran: a) la energía del primer orbital molecular no ocupado o LUMO ($E_{LUMO}$); b) la probabilidad de densidad electrónica en un determinado átomo de la molécula (el átomo genérico "a") ($f^N$); c) la misma densidad, normalizada respecto al LUMO (densidad de frontera o $F^N$); d) la carga parcial neta de cada átomo genérico ($Q_a$); e) la polaridad de la superficie molecular de van der Waals. Esta revisión, solo se considerará el parámetro ($Q_a$) o sea las cargas atómicas netas. Los otros parámetros se analizan en la Referencia 67.

La Tabla 5 muestra los valores de las cargas parciales netas para la β-lapachona (numeración de los átomos según la Figura 6). Valores similares se pueden calcular para las quinonas CG 8-935, CG 9-442 y CG 10-248. Los valores muestran que: a) la carga fue positiva en C1, C2 y C4 y negativa en los otros átomos de la molécula. Las mayores cargas positivas (> 0,250 electrón-volt) correspondieron a C1 y C2, mientras que las mayores cargas negativas correspondieron a O1, O2 y C3. Las menores cargas negativas (<0,050 electrón-volt) correspondieron a C5, C6 y C11. Valores intermedios se observaron en los otros átomos. En las mismas quinonas, la contribución iónica a los dipolos en C1 y C2, calculada con la fórmula de Smyth y electronegatividades de 2.5 (C) y 3.5 (O) unidades, resultó 20%. Si se comparan los valores promediados (Tabla 5) con los obtenidos para los mismos átomos de las mansononas[67], se comprueban diferencias importantes en C3 y C4. En C3, las cargas negativas fueron menores en valor absoluto que en la Tabla 5; en C4, las cargas fueron negativas en las mansononas A y C y positivas

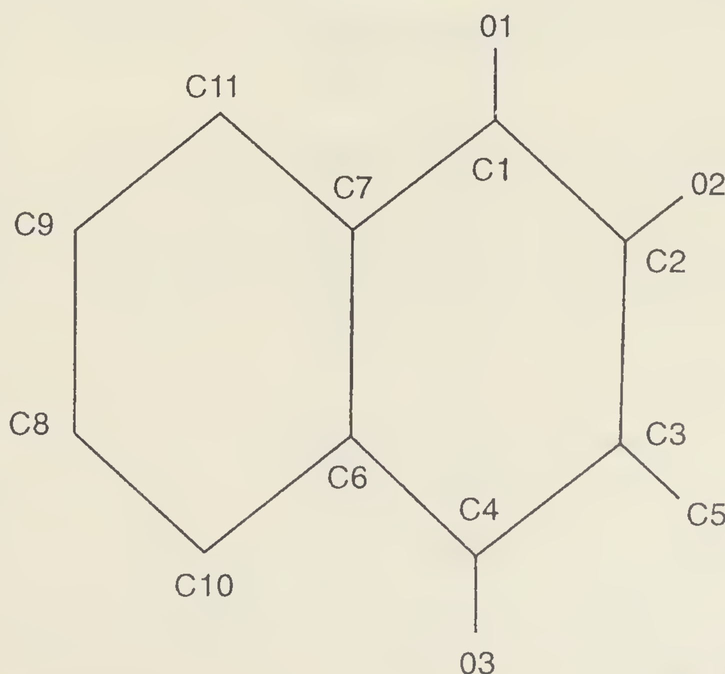



**Figura 6:** Numeración del núcleo de las quinonas, utilizadas en este trabajo.

en E y F, pero con menor valor absoluto que en las quinonas CG y la β-lapachona. En resumen, el cálculo de las cargas parciales netas mostró la existencia de un grupo de quinonas constituido por la β-lapachona y las quinonas CG, en las que los valores de Qa fueron estadísticamente coherentes, en particular los de mayor valor absoluto. Esa coherencia indica que la sustitución del metilo del anillo piránico por otros grupos no alcanzó a modificar la estructura electrónica del resto de la molécula.

La correlación de los parámetros químico–cuántico y la actividad oxidante de las naftoquinonas con dihidrolipoamida como sustratos, se verificó aplicando la ecuación a=bx + c dónde a es el ln de la actividad oxidante de la quinona y $x$ el valor de $Q_a$ en cada átomo de la molécula. Los valores del coeficiente de correlación r se presentan en la Referencia 67 dónde se puede ver que solamente los valores de $Q_a$ para C1, O1, C2 y O2 correlacionaron de manera significativa con la actividad oxidante de las quinonas, con valores de $r$ superiores a 0.80 y P menores de 0.001. En este contexto, la presencia de grupos "oxo" vecinos en C1 y C2 sería esencial, como lo demuestra la mayor actividad de las *o*-naftoquinonas (por ejemplo la β-lapachona) res-

**TABLA 5**
Cargas atómicas parciales netas en ß-lapachona y o-naftoquinonas CG.
Análisis de variancia.

| *Atomo* | *Promedio ± SD (n = 4)* | *Límites para 95% de probabilidad* |
|---|---|---|
| C1 | 0,272 ± 0,001 | 0,270 - 0,273 |
| C2 | 0,297 ± 0,001 | 0,293 - 0,299 |
| C3 | -0,302 ± 0,003 | -0,298 - 0,307 |
| C4 | 0,178 ± 0,002 | 0,175 - 0,181 |
| C5 | -0,030 ± 0,006 | -0,020 - 0,040 |
| C6 | -0,018 ± 0,005 | -0,010 - 0,027 |
| C7 | -0,143 ± 0,001 | -0,141 - 0,145 |
| C8 | -0,072 ± 0,001 | -0,053 - 0,084 |
| C9 | -0,100 ± 0,001 | -0,099 - 0,102 |
| C10 | -0,078 ± 0,001 | -0,077 - 0,079 |
| C11 | -0,045 ± 0,004 | -0,037 - 0,052 |
| 01 | -0,257 ± 0,001 | -0,255 - 0,258 |
| 02 | -0.270 ± 0,002 | -0,268 - 0,273 |
| 03 | -0,184 ± 0,002 | -0,183 - 0,185 |
| $E_{LUMO}$ | -1,388 ± 0,076 | -1,509 - 1,267 |

Atomos numerados según la Figura 6. Valores en electrón-volt. Las naftoquinonas CG son 8-935, 9-442 y 10-248.

pecto a las *p*-naftoquinonas (por ejemplo, la α–lapachona). El efecto de los átomos de oxígeno se explica por su mayor electro–afinidad (electrofilia) que atrae electrones π. El desplazamiento electrónico determina a) el valor relativamente alto de las cargas negativas en O1 y O2 de las *o*-naftoquinonas, o en O1 y O3 de las *p*-quinonas; b) la mayor carga negativa del oxígeno carbonílico (quinonas CG y β-lapachona) comparado con la carga del oxígeno enoil-éter (α–lapachona); c) las cargas positivas en los carbonos carbonílicos de las *o*-naftoquinonas, o las *p*-naftoquinonas, que contrasta con las cargas negativas en los otros carbonos de las mismas moléculas; d) el mayor efecto del oxígeno "oxo" (β-lapachona y análogos) comparado con el efecto del oxígeno enoil-éter (α–lapachona) sobre el mismo carbono. Una diferencia similar es notable en la carga de C4, que es menor cuando C4 está ligado al oxígeno enoil-éter (en la β-lapachona), comparada con la carga de C4 unido al oxígeno "oxo" de la α–lapachona y la menadiona; e) en las mansononas A y C la ausencia del tercer átomo de oxígeno, hace que la carga en C4 sea negativa, en contraste con la carga positiva de C4 en las mansononas E y F y las quinonas CG.

## CONSIDERACIONES FINALES

Las observaciones reseñadas en esta revisión demuestran que las *o*-quinonas lipofílicas tienen importantes actividades biológicas. En efecto, a) inhiben el crecimiento in vitro de protozoarios patógenos (*T. cruzi*) y no patógenos (*C. fasciculata* y *L. seymouri*); b) esas inhibiciones se producen a concentraciones de 0.1 a 10 μM, compatibles con usos terapéuticos de esas quinonas; c) la inhibición del crecimiento de los protozoarios implica diferentes efectos metabólicos, a saber, disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, aumento de la degradación fisiológica de esas macromoléculas e inhibición de la síntesis de ATP, un intermediario esencial para la energética celular. A estos efectos se debe agregar la capacidad para generar radicales libres del oxígeno, como consecuencia de reacciones redox reversibles. La multiplicidad del daño oxidativo, que afecta a los ADNs nuclear y mitocondrial, a los generadores de ATP (la fosforilación oxidativa) y a la síntesis de proteínas en retículo endoplásmico, es compatible con la intervención de oxi-radicales como intermediarios de la acción citotóxica de las quinonas.

El efecto de las quinonas depende de su estructura. Las *p*-quinonas, como la α–lapachona y el lapachol son mucho menos activa tanto en la acción citotóxica como en la producción de oxi-radicales. Lo mismo ocurre con la mansonona A, cuya estructura tetralina conspira contra la formación de semiquinonas. La estructura electrónica es el factor determinante del diferente comportamiento de las *o*-quinonas y las *p*-quinonas, como se explica en la sección correspondiente.

En los últimos años, se han descripto acciones de las *o*-naftoquinonas, que comprometen a las enzimas responsables del mantenimiento de la estructura y la replicación del ADN celular. Entre esas enzimas tienen función protagónica las topoisomerasas I y II (girasa). La primera corta una de las cadenas constituyentes de la doble hélice del ADN; la segunda corta las dos cadenas y depende de ATP. El resultado de esas acciones enzimáticas es la variación del enrollamiento ("supercoiling") y la catenación del ADN. Por otra parte, se conocen efectos de la β-lapachona sobre diferentes sistemas biológicos, ADN-dependientes como la transcriptasa reversa de mieloblastos y la del virus de la leucemia murina de Rauscher. Esas observaciones concuerdan con la inhibición de la topoisomerasa I por la β-lapachona, con el daño consiguiente de la reparación fisiológica del ADN. La acción inhibidora podría ser directa, es decir, no mediada por oxi-radicales. Una condición necesaria para obtener esas inhibiciones es la preincubación de la topoisomerasa con la β-lapachona. La presencia de ADN protege a la topoisomerasa I del efecto de la β-lapachona. Con la topoisomerasa II, la β-lapachona inactiva los complejos ADN-enzima. Como se ha dicho, la acción de la β-lapachona como citostático ha sido objeto de importantes estudios, especialmente por Boothman y colaboradores y Li y colaboradores. La

β-lapachona inhibe la transformación oncogénica de las células CHEF/18A y del carcinoma epidermoide, causada por radiación ionizante. Esos efectos se atribuyen a la inhibición de la topoisomerasa I, responsable de una reparación defectuosa del "daño potencialmente letal del ADN" (PLDR). La inhibición de la topoisomerasa I es un proceso complejo, en el que la presencia (o ausencia) de ADN o de otros inhibidores modifica la respuesta de la enzima a la β-lapachona. En efecto, en determinadas condiciones la β-lapachona puede activar la topoisomerasa I, no obstante la inhibición de PLDR. Otro efecto de la β-lapachona es la inducción de apoptosis en promielocitos de leucemia humana y con las células del tumor de próstata. Esos efectos implicarían un "encierro" de la quinona en la topoisomerasa I, con bloqueo del movimiento del ADN en el proceso de replicación de la doble hélice. Los efectos observados con células de tumor de próstata se obtienen con concentraciones de 8.0 μM de β-lapachona lo que permite suponer el uso clínico de la quinona. En la mayoría de las observaciones descriptas, la especificidad de la acción de la β-lapachona fue avalada por la ausencia de efectos similares de la α–lapachona y la menadiona. Por último, estudios con ADN y topoisomerasas purificadas han demostrado la posibilidad de una acción de la β-lapachona sobre topoisomerasa II. En este caso, efectos similares se han observado con la menadiona lo que resta especificidad al efecto de la β-lapachona. Otro efecto de singular importancia de la β-lapachona es la inhibición de la replicación del provirus del SIDA a concentraciones que no tienen efecto sobre las células animales. El sitio de la acción de la β-lapachona sería la "secuencia terminal larga" (LTR) de la molécula viral.

Se ha discutido el papel de los oxi-radicales en la acción citotóxica de la β-lapachona en particular, y las *o*-naftoquinonas en general. La mayoría de los últimos estudios con células vivas soslayan las reacciones redox de las *o*-quinonas y por lo tanto, la producción de oxi-radicales. Las quinonas, especialmente las *o*-naftoquinonas son moléculas muy reactivas y pueden modificar, por si mismas, grupos terminales de diferentes aminoácidos en moléculas proteicas, lo que determinaría la inhibición directa de la actividad enzimática. También el radical semiquinona puede afectar directamente las estructuras celulares, por ejemplo el ADN [68]. Sin embargo, la notable diferencia entre las actividades de la β-lapachona y la α-lapachona, correlaciona positivamente con la menor capacidad de esa *p*-quinona para generar oxi-radicales. Parece entonces razonable atribuir un papel importante a las "especies activas" del oxígeno en los efectos biológicos de las *o*-naftoquinonas. Cabe postular varios mecanismos de acción, a saber: a) la producción de oxi-radicales capaces de producir un daño del ADN, similar al de la radiación ionizante; b) la inhibición directa de enzimas, como las topoisomerasas; c) daño a otras estructuras celulares, como el ADN[68], las membranas citoplasmáticas, mitocondriales o el retículo endoplásmico. Esto impone la necesidad de estudios sistemáticos de la acción de oxi-radicales sobre las referidas estructuras celulares y las enzimas que las constituyen.

La multiplicidad de acciones y de sitios ("blancos") para la acción de las *o*-naftoquinonas en protozoarios, bacterias y células animales sugiere estudios comparativos en diferentes materiales biológicos normales o patológicos, si se quiere obtener información que permita utilizar esas moléculas con fines terapéuticos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo reseña las investigaciones realizados por investigadores, becarios y profesionales del Centro de Investigaciones Bioenergéticas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, según las referencias bibliográficas correspondientes. Se agradece especialmente la colaboración de los Dres. J. L. Affranchino, E. M. de Pahn, M. N. Schwarcz de Tarlovski, S. G. Goijman, M. A. Cataldi, C. M. Sreider, L. Grinblat, M.Hansz y N. Hickichi en diferentes temas y aspectos del proyecto.

## REFERENCIAS


1. Powis G. *Metabolism and reactions of quinoid anti-cancer agents.* Pharmac Ther, 1987; 35:57-162.
2. Powis G. *Free radical formation by antitumor quinones.* Free Radical Biol Med, 1989; 6:63-101.
3. Brunmark A, Cadenas E. *Redox and addition chemistry of quinoid compoundsand its biological implications.* Free Radical Biol Med, 1989; 7:435-477.
4. Monks T.J., Hanzlik R.P., Cohen G.M., Ross D., Graham D.G. *Quinone chemistry and toxicity.* Toxicol Appl Pharmacol, 1992; 112:2-16.
5. Cadenas E., Hochstein P. *Pro– and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells.* Advanc Enzymol, 1992; 65:97-146.
6. Morello A., Aldunate J., Letelier M.E., Repetto Y. *Bases bioquímicas de la acción de drogas antichagásicas.* Arch Biol Med Exp, 1988; 21:93-99.
7. Aldunate J., Traipe L., Spencer P., Morello A., Repetto Y. *Effects of hydroquinones on intact Trypanosoma cruzi epimastigotes.* Comp Biochem Physiol, 1992; 103C:97-100.
8. Aldunate I., Morello A., *Free radicals in the mode of action of antiparasitic drugs.*In Aruoma O.I. (ed.): *Free radicals in tropical diseases.* Reading, Great Britain: Reading, Great Britain Harwood Academic Publishers, pp. 137-165, 1993.
9. Boothman D.A., Pardee A.B. *Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by β-lapachone.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86:4963-4967.
10. Li C.J., Averboukh L., Pardee A.B. *β-lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin.* J Biol Chem, 1993; 268:22463-22468.
11. Li C.J., Wang C., Pardee A.B. *Induction of apoptosis by β-lapachone in human prostate cancer cells.* Cancer Res, 1995; 55:3712-3715.
12. Planchon S.M., Wuerzberger S., Frydman B., Witiak D.T., Hutson P., Church D.R., Wilding G., Boothman D.A. *β-Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p 53-independent response.* Cancer Res, 1995; 55:3706-3711.
13. Goncalvez de Lima O., D'Albuquerque I.L., Goncalvez de Lima C., Maia D. *Substancias antimicrobianas de plantas superiores.* Revta Inst Antibiot Univ Recife, 1962; 4:3-17.
14. Santana C.F., Lima O.G., D'Albuquerque I.L., Lacerda A.L., Martins D.G. *Observaçoes sôbre as propriedades anti-tumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (Tabebuia avellanedae).* Revta Inst Antibiot Univ Recife, 1968; 8:89-94.
15. Ferreira de Santana C., Gonçalvez de Lima O., D'Albuquerque L., Lins Lacerda A., Gimino Martins D. *Observaçoes sobre as propriedades anti-tumorais e toxicológicas do extrato de líber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (Tabebuia avellanedae).* Revta Inst Antibiot Univ Recife, 1968; 8:89-94.
16. D'Albuquerque I.L, Maciel M.C.N., Schuler A.R., de Araujo M. do C., Medeiros Maciel G., Cavalcanti M. da S.B., Gimino Martins D., Lins Lacerda A. *Preparaçao e primeiras observaçoes sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homóiogos inferiores na série da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol).* Revta Inst Antibiot Univ Recife, 1972; 12:31-40.
17. Docampo R., Lopes J.N., Cruz J.S., De Souza W. *Trypanosoma cruzi: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β-lapachone.* Exp Parasitol, 1977; 42:142-149.
18. Boveris A., Docampo R., Turrens J.F., Stoppani A.O.M. *Effect of β-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production by Trypanosoma cruzi.* Biochem J, 1978; 175:431-439.
19. Boveris A., Stoppani A.O.M., Docampo R., Cruz F.S. *Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on Trypanosoma cruzi.* Comp Biochem Physiol, 1978; 61C:327-329.
20. Cruz F.S., Docampo R., de Souza W. *Effect of β-lapachone on hydrogen peroxide production in Trypanosoma cruzi.* Acta Trop, 1978; 35:35-40.

21. LOPEZ J.N., CRUZ F.S., DOCAMPO R., VASCONCELLOS M.E., SAMPAIO M.C.R., PINTO A.V., GILBERT B. *In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against Trypanosoma cruzi.* Ann Trop Med Parasitol, 1978; 72:523-531.
22. DOCAMPO R., CRUZ F.S., BOVERIS A., MUNIZ R.P.A., ESQUIVEL D.M.S. *Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion and hydrogen peroxide in β-lapachone-treated Trypanosoma cruzi epimastigotes.* Arch Biochem Biophys, 1978; 186:292-297.
23. DOCAMPO R., CRUZ F.S., BOVERIS A., MUÑIZ R.P.A., ESQUIVEL D.M.S. *β-lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells.* Biochem Pharmacol, 1979; 28:723-728.
24. GOIJMAN S.G., STOPPANI A.O.M. *Effects of β-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in Trypanosoma cruzi.* Arch Biochem Biophys, 1985; 240:273-280.
25. DUBIN M., FERNANDEZ VILLAMIL S.H., STOPPANI A.O.M. *Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β-lapachone and related naphthoquinones.* Biochem Pharmacol, 1990; 39:1151-1160.
26. FERNÁNDEZ VILLAMIL S.H., DUBIN M., GALEFFI C., STOPPANI A.O.M. *Effects of mansonones on lipid peroxidation, P-450 monooxygenase activity, and superoxide anion generation by rat liver microsomes.* Biochem Pharmacol, 1990; 40:2343-2351.
27. DEGRASSI F., DE SALVIA R., BERGHELLA L. *The production of chromosomal alterations by β-lapachone, an activator of topoisomerase I.* Mutat Res, 1993; 288:263-267.
28. SCHAFFNER-SABBA K., SCHMIDT-RUPPIN K.H., WEHRLI W., SCHUERCH A.R., WASLEY J.W.F. *β-lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models.* J Med Chem, 1984; 27:990-994.
29. LI C.J., ZHANG L.J., DEZUBE B.J., CRUMPACKER C.S., PARDEE A.B. *Three inhibitors of type 1 human inmunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90:1839*1842.
30. *BOOTHMAN D.A., TRASK D.K., PARDEE A.B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β-lapachone, an activator of topoisomerase I.* Cancer Res, 1989; 49:605-612.
31. FRYDMAN B., MARTON L.J., SUN J.S., NEDER K., WITIAK D.T., LIU A.A., WANG H-M., MAO Y., WU H-Y., SANDERS M.M., LIU L.F. *Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β-lapachone and related naphthoquinones.* Cancer Res, 1997; 57:620-627.
32. GUIRAUD P., STEIMAN R., CAMPOS-TAKAKI G-M., SEIGLE-MURANDI F., DE BUOCHBER M.S. *Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β-lapachone.* Planta Med, 1994; 60:373-374.
33. PAHN E.M. DE, MOLINA PORTELA M.P., STOPPANI A.O.M. *Efecto de quinonas y nitrofuranos sobre Trypanosoma mega y Crithidia fasciculata.* Rev Arg Microbiol, 1988; 20:107-118.
34. MOLINA PORTELA M.P., PAHN E.M. DE, GALEFFI C., STOPPANI A.O.M. *Efecto de orto–naftoquinonas lipofílicas sobre el crecimiento y la producción de peróxidos por Leptomonas seymouri y Crithidia fasciculata.* Rev Arg Microbiol, 1991; 23:1-14.
35. MOLINA PORTELA M.P., FERNANDEZ VILLAMIL S.H., PERISSINOTTI L.J., STOPPANI A.O.M. *Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production.* Biochem Pharmacol, 1996; 52:1875-1882.
36. MARINI-BETTOLO G.B., CASINOVI C.G., GALEFFI C. *A new class of quinones: sesquiterpenoid quinones of Mansonia altissima* Chev. Tetrahedron Lett, 1965; 52:4857-4864.
37. TANAKA N., YASUE M., IMAMURA H. T*he quinonoid pigments of Masonia altissima wood.* Tetrahedron Lett, 1966; 24:2767-2773.
38. GALEFFI C., CASINOVI C.G., MIRANDA DELLE MONACHE E., MARINI-BETTOLO G.B. *Chinoni sesquiterpenici della Mansonia Altissima* Chev. - Nota II. Ann Ist Super Sanita, 1968; 4:305-316.
39. MOLINA PORTELA M.P., STOPPANI A.O.M. *Redox cycling of β-lapachone in the presence of dihydrolipoamide and oxygen.* Biochem Pharmacol, 1996; 51:275-283.

40. Schwarcz de Tarlovsky M.N., Goijman S.J., Stoppani A.O.M. *Inhibicion del crecimiento y la sintesis de DNA y formacion de anion superoxido por quinona-iminas en Trypanosoma cruzi.* Rev Arg Microbiol, 1988; 20:183-194.
41. Schwarcz de Tarlovsky M.N., Goijman S.G., Molina Portela M.P., Stoppani A.O.M. *Effect of isoxazolyl naphthoquinoneimines on growth and oxygen radical production by Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata.* Experientia, 1990; 46:502-505.
42. Amuchastegui P.I., Moretti E.R.A., Basso B., Sperandeo N., Bertorello M. M. de. *Isoxazolylnaphthoquinone effects on the growth of Trypanosoma cruzi.* Rev Arg Microbiol, 1990; 22:199-207.
43. Bogdanov P.M., Albesa I., Speramdeo R.N., Martínez de Bertorello M. *Actividad amtibacteriana in vitro de isoxazolil naftoquinonas.* I. Rev Arg Microbiol, 1993; 25:119-128.
44. Goijman S.G., Turrens J.F., Marini-Bettolo J.B., Stoppani A.O.M. *Inhibicion del crecimiento y la biosintesis de macromoleculas en Trypanosoma cruzi por productos naturales.Efectos de la miconidina y la tingenona.* Medicina-Buenos Aires, 1984; 44:361-370.
45. Goijman S.G., Turrens J.F., Marini-Bettolo G.B., Stoppani A.O.M. *Effect of tingenone, a quinonoid triterpene on growth and macromolecule biosynthesis in Trypanosoma cruzi.* Experientia, 1985; 41:646-648.
46. Bacchi C.J., Lambros C., Goldberg B., Hutner S.H., De Carvallo G.D.F. *Susceptibility of and insect Leptomonas and Critidia fasciculata to several established antitrypanosomatid agents.* Antimicrob Agents Chemother, 1974; 6:785-790.
47. Goldberg B., Lambros C., Bacchi C.J., Hutner S.M. *Inhibition by several standard antiprotozoal drugs of growth and* $O_2$ *uptake of cells and particulate preparations of a Leptomonas.* J Protozool, 1974; 21:322-326.
48. Biscardi A.M., Fernandez Villamil S.H., Stoppani A.O.M. *Inhibicion de la oxidacion fosforilante en Crithidia fasciculata y Trypanosoma cruzi por o-quinonas lipofilicas y nifurtimox.* Rev Arg Microbiol, 1994; 26:72-86.
49. Toner J.J., Weber M.M. *Respiratory control in mitochondria from Crithidia fasciculata.* Biochem Biophys Res Commun, 1972; 46:652-660.
50. Kusel J.P., Storey B.T. *CO-binding pigments and the functional terminal oxidase of the trypanosomatid hemoflagellate Crithidia fasciculata.* Biochim Biophys Acta, 1973; 314:164-177.
51. Kusel J.P., Boveris A., Storey B.T. $H_2O_2$ *production and cytochrome c peroxidase activity in mitochondria isolated from the trypanosomatid hemoflagellate.* Arch Biochem Biophys, 1973; 158:799-805.
52. Stoppani A.O.M, Boiso F.J. de. *Oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi.* Experientia, 1973; 29:1494-1496.
53. Stoppani A.O.M., Docampo R., Boiso J.F. de, Frasch A.C.C. *Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on Trypanosoma cruzi respiration and growth.* Mol Biochem Parasitol, 1980; 2:3-21.
54. Affranchino J.L., Tarlovsky M.N.S. de, Stoppani A.O.M. *Respiratory control in mitochondria from Trypanosoma cruzi.* Mol Biochem Parasitol, 1985; 16:289-298.
55. Cataldi de Flombaum M.A., Stoppani A.O.M. *Inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase from Trypanosoma cruzi by oxygen radicals: role of thiol groups.* Biochem Int, 1987; 14:1035-1041.
56. Garcia P., Galeffi C., Stoppani A.O.M. *Algunas propiedades de la cadena de transporte de electrones mitocondrial de Crithidia fasciculata: su interacción con o-quinonas lipofílicas.* Rev Arg Microbiol, 1992; 24:21-31.
57. Sinet P-M., Garber P. *Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to* $O_2$*- and* $H_2O_2$. Arch Biochem Biophys, 1981; 212:411-416.
58. Le Trant N., Meshnick S.R., Kitchener K., Eaton J.W., Cerami A. *Iron-containing superoxide dismutase from Crithidia fasciculata.* J Biol Chem, 1983; 258:125-130.

59. YAMAKURA F., SUZUKI K. *Inactivation of Pseudomonas iron-superoxide dismutase by hydrogen peroxide.* Biochim Biophys Acta, 1986; 874:23-29.

60. BEYER W.F., FRIDOVICH I. *Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of Escherichia coli.* Biochemistry, 1987; 26:1251-1257.

61. PENKETH P.G., KLEIN R.A. *Hydrogen peroxide metabolism in Trypanosoma brucei.* Mol Biochem Parasitol, 1986; 20:111-121.

62. PENKETH P.G., KENNEDY W.P.K., PATTON C.L., SARTORELLI A.C. *Trypanosomatid hydrogen peroxide metabolism.* FEBS Lett, 1987; 221:427-431.

63. PENKETH P.G., KENNEDY W.P.K., PATTON C.L., SARTORELLI A.C. *Competent metabolic utilization of hydrogen peroxide by trypanosomes.* Acta Trop, 1987; 44:461-462.

64. ROSS D. *Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents.* Pharmac Ther, 1988; 37:231-249.

65. BIAGLOW J.E., VARNES M.E., EPP E.R., CLARK E.P., TUTTLE S.W., HELD K.D. *Role of glutathione and other thiols in cellular response to radiation and drugs.* Drug Metab Rev, 1989; 20:1-12.

66. WARDMAN P. *Bioreductive activation of quinones: redox properties and thiol reactivity.* Free Rad Res Comms, 1990; 8:219-229.

67. PAULINO M., HANSZ M., HIKICHI N., TABARES G., MOLINA PORTELA M.P., FERNÁNDEZ VILLAMIL S.H., SREIDER C.M., STOPPANI A.O.M. *Propiedades electrónicas y actividad redox de naftoquinonas.* An Asoc Quim Argent, 1994; 82:371-389.

68. MORGAN W.A. *DNA single-strand breakage in mammalian cells induced by redox cycling quinones in the absence of oxidative stress.* J. Biochem Toxicol, 1995; 10:227-232.

Anales de la Sociedad Científica Argentina, Volumen 227 - Número Especial, 1997 (139 - 155)

# LAS LIPOPROTEINAS HEMOLINFATICAS DE INSECTOS

*Rodolfo Brenner*

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, Facultad de Ciencias Médicas, calles 60 y 120, (1900) La Plata, Argentina.

## RESUMEN

Los insectos utilizan lipoproteínas, un mecanismo muy evolucionado para el transporte de los lípidos por la hemolinfa. En el caso del *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas, fue posible separar, identificar y analizar tres lipoproteínas de insectos machos y una cuarta específica de insectos hembras. Por ultracentrifugación de la hemolinfa en gradiente de densidad se separa primero la lipoforina (HDLp) de densidad 1,10 g/ml, luego una lipoproteína de peso molecular 20.000 antes llamada VHDL-I, de densidad 1,21 g/ml y la lipoproteína de muy alta densidad VHDL, densidad 1,27 g/ml. La lipoforina es el principal componente de la hemolinfa, tiene un peso molecular de 743.000 y está constituida por dos apolipoproteínas de 255.000 y 78.000 Daltons que están glicosiladas y cuya composición de aminoácidos fue determinada. El contenido de lípidos es de 47%, pero varía. Estos lípidos están constituidos principalmente por diacilgliceroles y fosfolípidos, pero transportan también colesterol, ácidos grasos libres e hidrocarburos pero pocos triacilgliceroles. La lipoproteína de peso molecular 20.000 no se asocia a la lipoforina y está constituida por una apoproteína de PM 16.000. Tiene 3% de lípidos, principalmente hidrocarburos. Se estudió la composición de aminoácidos y secuencia N-terminal. La VHDL es una "hexamerina de depósito" formada por 6 unidades de una apolipoproteína de PM 77.000. Transporta principalmente ácidos grasos libres y se la encuentra en ninfas del 5° estadío e insectos adultos. Se determinó su composición en aminoácidos y secuencia N-terminal.

---

*En homenaje al Dr. Pedro Cattáneo.*

## SUMMARY

Insects utilize hemolymphatic lipoproteins for the lipid transport; this is a highly developed mechanism. With respect to *Triatoma infestans* which is the vector of Chagas disease, it was possible to separate, identify and analyse three lipoproteins from male insects and a fourth one that is specific of females. Hemolymph was ultracentrifuged in a density gradient in order to separate first lipophorin (HDLp) 1.10 g/ml density, then a lipoprotein of 20,000 molecular weight that was previously named VHDL-I, 1.21 g/ml density, and a very high density lipoprotein (VHDL) of 1.27 g/ml. Lipophorin is the principal component of hemolymph with a molecular weight of 743,000 and it is composed of two apolipoproteins of 255,000 and 78,000 daltons which are glycosilated and their aminoacid composition was determined. The lipid content is 47%, but it may vary. The lipids are mainly composed of diacylglycerols. The lipoprotein of 20,000 molecular weight is apoprotein of 16,000 MW. It has 3% lipids and mainly hydrocarbons. The aminoacid composition and the N-terminal sequence were also studied. The VHDL is a "storage hexamerin", formed by six units of an apolipoprotein of 77,000 MW. It transports free fatty acids and is found in 5th instar nymphs and adult insects. Its aminoacid composition and N-terminal sequence were determined.

En el hombre el transporte de los lípidos en la sangre es realizado por lipoproteínas y éstas han sido intensamente estudiadas principalmente en los últimos tiempos. Estas lipoproteínas han sido clasificadas de diversas maneras. Una de ellas ha sido en base a su densidad hidratada [1] los quilomicrones (d< 0,94), las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad d 0,94 - 1,006), las LDL (lipoproteínas de baja densidad d 1,006 - 1,063), las HDL (lipoproteínas de alta densidad d 1,063 - 1,20) y los NEFA (ácidos grasos no esterificados, unidos a la albúmina). Todas ellas son asociaciones de diversas proteínas denominadas apoproteínas con lípidos, salvo los NEFA que son un poco diferentes.

Los lípidos fundamentales son los fosfolípidos, los triacilgliceroles, los ésteres de colesterol, el colesterol y los ácidos grasos.

En los insectos, trabajos pioneros demostraron que los lípidos predominantes que transportan los ácidos grasos en la hemolinfa son los diacilgliceroles [2, 4].

Los insectos estudiados específicamente en estos casos fueron la polilla gigante *(Hyalophora cecropia)*, la cigarra *(Melarrophis differentialis)*, la cucaracha americana *(Periplaneta americana)*, y la langosta *(Locusta migratoria)*.

Esta presencia de diacilgliceroles diferencia radicalmente las lipoproteínas de insectos de las humanas que contienen triacilgliceroles.

La lipoproteína específica y principal de insectos que transporta los diacilgliceroles fue aislada por Chino y col. [5] de la hemolinfa pupal del gusano de seda *Philosamia* y denominada "diacylglycerol-carrying lipoprotein" (DGLP). En 1968, sin embargo, Thomas y Gilbert [6] publicaron un trabajo en el que se referían ya a las lipoproteínas hemolinfáticas aisladas por ultracentrifugación en gradiente de densidad en la polilla gigante americana *Hyalophora cecropia*. Según este trabajo clasificaron a las lipoproteínas por su densidad hidratada por comparación con las humanas en dos grandes grupos, las de alta densidad (HDL d 1,06 - 1,21) y las de muy alta densidad (VHDL d 1,21 - 126). La de alta densidad (HDL) resultó ser igual a la DGLP de Chino y col. Esta lipoproteína fue denominada posteriormente en 1981, lipoforina por Chino y col. [7] y este nombre ha perdurado. Proviene del griego lipos (lípido) y phoros (que contiene).

La importancia del metabolismo lipídico y el transporte de los lípidos por lipoproteínas resulta ser uno de los grandes éxitos de los insectos para adaptarse al medio ambiente.

# LIPOPROTEINAS HEMOLINFATICAS DEL *TRIATOMA INFESTANS*

Del punto de vista de su importancia nacional a nosotros nos interesó estudiar el metabolismo lipídico y el transporte de los lípidos por la hemolinfa en el *Triatoma infestans* (vinchuca), vector principal de la enfermedad Chagas-Mazza en nuestro país.[8]

El *Triatoma infestans* es un insecto que pertenece a la subclase Pterigota, división Hemimetabola, orden Hemíptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. Es hematófago y es vector como se dijo de la enfermedad de Chagas-Mazza. El *Trypanosoma cruzi* realiza su fase invertebrada en el tubo digestivo del insecto. La infección se realiza como consecuencia de la defecación del insecto que tiene lugar en el momento que se alimenta sobre el hombre.

El *Triatoma infestans* es hemimetábolo porque en el momento de la eclosión del huevo, la ninfa es una réplica en miniatura del insecto adulto, del cual se diferencia por áptera y no tener diferenciados sus órganos sexuales. El pasaje de huevo a adulto se verifica a través de 5 estadíos ninfales con mudas correspondientes.

En un trabajo pionero, en 1981, Fichera y Brenner [9, 11] pudieron demostrar por primera vez que en la hemolinfa de *T. infestans* machos existían lipoproteínas separables por medio de ultracentrifugación en un gradiente de densidad. En esas circunstancias se separaron tres picos lipoproteicos, uno con densidad 1,10 g/ml denominado HDL (lipoproteína de alta densidad), otro muy próximo de d 1,21 g/ml denominado VHDL-I (lipoproteína de muy alta densidad I) y el último VHDL-II (lipoproteína de muy alta densidad II) de densidad de flotación 1,27 g/ml (Fig. 1). Posteriormente trabajando con hemolinfa de hembras, Fichera y Brenner [11] pudieron reconocer una cuarta lipoproteína específica de ellas con una densidad hidratada (d 1,23 g/ml) entre la VHDL-I y VHDL-II que denominamos lipoproteína femenina de muy alta densidad (VHDL-f).

Determinado el contenido de lípidos y proteínas de esas lipoproteínas crudas se halló que el mayor contenido de lípidos radicaba en la lipoproteína HDL [11]. Esta lipoproteína HDL por comparación con el trabajo de Chino y col. [7] fue llamada lipoforina y reconocida como la misma lipoproteína y denominada de ahora en adelante HDLp. En la Tabla 1 se detalla la proporción de lípidos y proteínas de las diversas lipoproteínas del *T. infestans* determinadas en tal oportunidad[11].

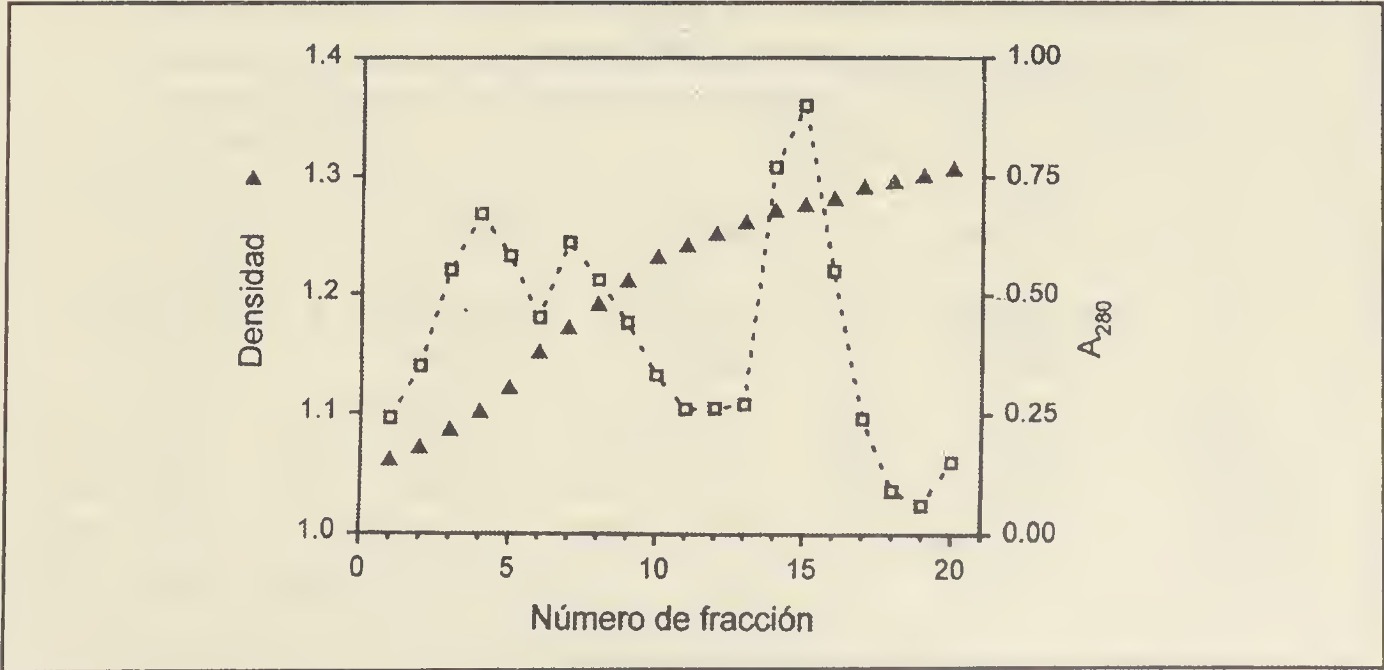



**Figura 1:** Perfil lipoproteico de la hemolinfa de *T. infestans* machos obtenido por ultracentrifugación en gradiente de densidad.

# LIPOFORINA

La HDLp es la lipoproteína más importante de las lipoproteínas hemolinfáticas del *T. infestans* e insectos en general. La lipoforina del *T. infestans* fue aislada y purificada cuidadosamente en nuestro laboratorio [12] por doble ultracentrifugación en un gradiente de densidad de BrNa. El radio de Stokes determinado fue aproximadamente de 73A° y el peso molecular calculado según el método de Margolis[13] fue 743.000 Daltons.

La composición lipídica de la HDLp de *T. infestans* machos está detallada en la Tabla 2 donde se observa claramente el predominio de los diacilgliceroles. Estos tienen la estructura 1, 2 pese a que siempre en los cromatogramas de capa fina aparece una cierta proporción de isómeros 1, 3. Eso se debe a una migración interna producida en el procesamiento de las muestras. La estructura sn-1,2 de los diacilgliceroles hemolinfáticos fue cuidadosamente estudiada por Lock y Van der Horst[14] y hallaron que tenían una pureza del 96%.

El contenido de los otros lípidos neutros, triacilgliceroles, colesterol y ácidos grasos es bajo. Sin embargo, la lipoforina transporta una proporción importante de hidrocarburos de la lipoforina de hembras realizado por cromatografía gaseosa [11] demostró que estaban constituidos por hidrocarburos ramificados con uno o más metilos. La longitud de cadena de los hidrocarburos ramificados se extendía entre 29 y 41 carbonos. Los hidrocarburos lineales predominantes fueron el de 29 carbonos (2,9%), el de 31 carbonos (18,9%) y el de 33 carbonos (38%). Los hidrocarburos ramificados predominan sobre los hidrocarburos lineales.

Los lípidos importantes en la composición de la HDLp son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina. Predomina la fosfatidiletanolamina en un tenor doble al del fosfolípido de colina. Estos dos fosfolípidos juegan un papel importante en la estructuración de la lipoforina[15], ubicándose en la parte externa de la partícula lipoproteica[16] debido a sus propiedades anfipáticas.

La composición de los ácidos grasos de 14 a 18 carbonos determinada por cromatografía gaseosa de los diversos lípidos de la HDLp de insectos adultos alimentados está recopilada en la Tabla 3 [10]. Pero esta composición varía según los alimentos o estado de ayuno [10]. La composición grasa deriva de dos fuentes, la sangre que les servirá de alimento a los insectos y la biosíntesis endógena. La sangre suministra no sólo los ácidos sintetizables por el insecto sino tam-

**TABLA 1**
**Composición de las lipoproteínas hemolinfáticas de *T. infestans* machos y hembras alimentados [11]**

| | LIPIDOS* | | | | PROTEINAS** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Machos | | Hembras | | Machos | | Hembras | |
| | En hemolinfa mg/ml | % | En hemolinfa mg/ml | % | En hemolinfa mg/ml | % | En hemolinfa mg/ml | % |
| Lipoforina | 2,8 | 51,5 | 1,6 | 43,0 | 2,65 | 48,5 | 2,06 | 57,0 |
| VHDL-I | 0,67 | 7,0 | 0,11 | 4,1 | 8,55 | 93,0 | 2,57 | 95,9 |
| VHDL-f | ausente | | 0,09 | 8,1 | ausente | | 1,02 | 91,9 |
| VHDL-II | 0,24 | 6,0 | 0,07 | 1,3 | 3,80 | 94,0 | 5,00 | 98,7 |

* Los lípidos se determinaron gravimétricamente.
** Se determinaron por el método de Lowry.

bién los ácidos no saturados linoleico y araquidónico que no puede sintetizar [17] por carecer de una Δ6 y Δ5 desaturasa.

La biosíntesis de *novo* de ácidos saturados y no saturados monoetilénicos se realiza en el *T. infestans* a partir de la acetil-CoA por acción de un ácido graso sintetasa y Δ9 desaturasas [17,19]. Se produce principalmente en el cuerpo graso [17,19] que cumple en el insecto las funciones simultáneas del hígado y el tejido adiposo de los vertebrados, pero también en el integumento cuticular [20].

El ácido araquidónico (20:4) no figura en las composiciones detalladas en la Tabla 3 porque no fue computado en ese análisis, pero es un componente importante de los fosfolípidos de los tejidos gonadales del *T. infestans* [21], especialmente el fosfatidilinositol y da lugar a prostaglandinas [22]. Es transportado a esos tejidos por la lipoforina.

Los diacilgliceroles de la lipoforina del *T. infestans* tiene un origen dual, por una parte son

**TABLA 2**
**Composición porcentual relativo de los lípidos de la lipoforina de *T. infestans* machos.**

| LIPIDO | % |
|---|---|
| Monoacilgliceroles | Trazas |
| Diacilgliceroles | 41,4 ± 1,9 |
| Triacilgliceroles | 4,1 ± 0,1 |
| Esteroles | 4,7 ± 0,3 |
| Acidos grasos libres | 6,1 ± 0,2 |
| Esteres de colesterol | Trazas |
| Hidrocarburos | 12,2 ± 0,8 |
| Fosfatidiletanolamina | 20,2 ± 1,7 |
| Fosfatidilcolina | 11,3 ± 0,7 |

Los resultados son el promedio de 5 muestras ±DS.

**TABLA 3**
**Composición de los ácidos grasos de 14 a 18 carbonos de los diversos lípidos de la lipoforina de *T. infestans* alimentados con sangre de paloma [10]**

| Acidos grasos | 1,2 DG | TG | AG | FC | FE |
|---|---|---|---|---|---|
| 14:0 | 1,1 | 12,4 | 3,4 | — | 1,1 |
| 16:0 | 28,1 | 25,5 | 32,7 | 17,3 | 25,5 |
| 16:1 | 5,5 | 5,5 | 7,2 | 2,2 | 5,2 |
| 18:0 | 10,4 | 12,6 | 18,0 | 23,9 | 19,8 |
| 18:1 | 45,2 | 35,9 | 37,0 | 48,0 | 36,5 |
| 18:2 | 9,7 | 8,1 | 1,7 | 8,6 | 12,1 |

Resultados expresados en % en peso.
1,2 DG, 1,2 diacilgliceroles; TG: triacilgliceroles; AG: ácidos libres;
FC: fosfatidilcolina; FE: fosfatidiletanolamina.

provistos por el cuerpo graso, por hidrólisis de sus triacilgliceroles constituyentes [17] que a su vez son sintetizados a partir de los ácidos grasos por el camino del glicerolfosfato, y por el tracto intestinal [23]. En efecto, Rimoldi y col. [23] demostraron que suministrando trioleil $1^{14}C$ glicerol por tracto gástrico al *T. infestans* éste era hidrolizado en el estómago medio y convertido a dioleil $1^{14}C$ glicerol que era incorporado a la lipoforina antes de llegar al cuerpo graso.

La lipoforina también transporta carotenos[10] y como ya vimos en la Tabla 2, colesterol. Este colesterol es de origen exógeno ya que no es sintetizado por los insectos.

Como todas las HDLp de insectos, la lipoforina del *T. infestans* contiene 2 apoproteínas, la Apo-Lp I de peso molecular 255.000 y la Apo-Lp II de 78.000 [12]. Estas proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gradiente sobre un gel de dodecilsulfato-poliacrilamida. También se separaron por la técnica de Shapiro y col. [24] disociándolas en clorhidrato de guanidina y aislándolas en una columna de Sepharosa Cl - 6B [12].

Ambas apolipoforinas están glicosiladas y su composición en aminoácidos está resumida en la Tabla 4. Ambas tienen una composición similar con aproximadamente 40% de aminoácidos no polares. Aspartato, leucina y glutamato son los componentes predominantes, presentando un muy bajo contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína). Es necesario señalar, sin embargo, que la Apo-Lp I contiene más triptofano que la Apo-Lp II y menos alanina. Ambas apolipoproteínas son inmunológicamente diferentes [12].

Cuando la lipoforina fue tratada con tripsina, la Apo-Lp I fue hidrolizada mientras la Apo-Lp II no lo fue [12]. Este es un comportamiento similar al hallado con las apolipoforinas de *Manduca sexta* [25] y *Apis mellifera* [26]. Dado que la tripsina hidroliza principalmente las uniones peptídicas de la arginina y lisina y ambas apolipoforinas contienen cantidades importantes y similares de estos aminoácidos, la diferente reactividad entre Apo-Lp I y Apo-Lp II debe ser atribuida a una posición superficial para la Apo-Lp I y a una posición críptica para la Apo-Lp II.

Una información adicional sobre la localización superficial de la Apo-Lp I en la partícula de lipoforina del *T. infestans* fue suministrada en nuestro laboratorio en el trabajo de Soulages y col. [27]. En dicho trabajo no sólo se estudiaron las transiciones termotrópicas de la lipoforina del *T. infestans* sino también el efecto “quenching” de los ácidos *cis* y *trans* parinárico y 1.6 difenilhexatrieno sobre la intensidad de la fluorescencia del triptofano de la lipoforina. Se demostró que la apoproteína está localizada en una posición más próxima a la superficie que a la zona hidrofóbica dado que el efecto “quenching” que produce el ácido parinárico (zona superficial) sobre la fluorescencia del triptofano es mayor que el que produce el 1.6 difenilhexatrieno (zona hidrofóbica interior).

Un estudio global sobre la estructura de las partículas de lipoforina del *T. infestans* comparadas con otros insectos fue realizado por Soulages y Brenner [15] considerando las propiedades fisicoquímicas de los diversos lípidos y apoproteínas constituyentes y el espacio molecular que ocupan. El modelo propuesto es consistente con partículas de las siguientes características: Partículas esferoides con una capa externa rica en proteínas de aproximadamente 20-21 A° de espesor constituida por proteínas, fosfolípidos, colesterol y pequeñas cantidades de diacilgliceroles y un centro interior rico en lípidos constituidos por hidrocarburos, triglicéridos y el remanente importante de los diacilgliceroles. Las características fisicoquímicas de los diacilgliceroles y su proporción son incompatibles con una presencia mayoritaria en la capa externa de las partículas de lipoforina. De cualquier manera sus características y situación deben ser tales que pueden ser movilizadas de la lipoforina al llegar a los tejidos destinatarios en los cuales se metabolizan los ácidos grasos constituyentes.

Es importante señalar que si bien Soulages y Brenner [15] consideraron que los fosfolípidos juegan un papel importante en la estructura y estabilidad de la partícula de lipoforina, Rimoldi y col. [28] confirmaron que removiendo los fosfolípidos de la lipoforina con fosfolipasa $A_2$ se modifica esta estructura. Mediciones de transferencia de energía entre el triptofano de las apoproteínas a varios aceptores fluorescentes demostraron que la remoción de los fosfolípidos produ-

ce una reacomodación de las apoproteínas y la formación de partículas estables con una mayor relación molecular de diacilglicerol/fosfolípidos en la capa superficial lipídica.

En las lipoforinas de algunos insectos en período de inactividad ha sido detectado un tercer tipo de apoproteína denominada Apo-Lp III de peso molecular alrededor de 16.000 a 20.000 [29]. Mientras la Apo-Lp I y la Apo-Lp II están asociadas con todas las formas de lipoforinas, la Apo-LpIII está asociada con ciertos tipos de lipoforinas pero generalmente está libre en la hemolinfa. Una apoproteína fue aislada por Rimoldi y col. [22] de la hemolinfa del *T. infestans* en una

**TABLA 4**

**Composición de aminoácidos de proteínas de la lipoforina.**

| Aminoacido | ApoLp-I Mol% | ApoLp-I Residuos /mol | ApoLp-II Mol% | ApoLp-II Residuos /mol |
|---|---|---|---|---|
| Aspartato[a] | 14,8 | 297 | 11,1 | 69 |
| Treonina | 7,6 | 153 | 6,1 | 38 |
| Serina | 7,6 | 153 | 7,7 | 48 |
| Glutamato[a] | 9,9 | 199 | 11,9 | 74 |
| Prolina | 2,6 | 52 | 3,3 | 20 |
| Glicina | 5,4 | 110 | 6,5 | 40 |
| Alanina | 6,6 | 133 | 10,8 | 67 |
| Valina | 9,4 | 189 | 8,0 | 49 |
| Metionina | 0,3 | 6 | 0,9 | 6 |
| Isoleucina | 2,1 | 42 | 1,5 | 9 |
| Leucina | 11,0 | 221 | 11,3 | 70 |
| Tirosina | 3,4 | 68 | 3,1 | 19 |
| Fenilalanina | 4,8 | 98 | 3,4 | 21 |
| Histidina | 2,9 | 58 | 2,8 | 17 |
| Lisina | 7,2 | 145 | 8,1 | 50 |
| Arginina | 2,7 | 54 | 2,8 | 17 |
| Cisteína[b] | 0,4 | 8 | 0,4 | 3 |
| Triptofano[c] | 1,6 | 33 | 0,5 | 3 |
| **Total** | **100,3** | **2019** | **100,2** | **620** |
| Porcentaje no polar | 38,4 | | 39,7 | |
| Porcentaje polar sin carga | 24,4 | | 23,8 | |
| Porcentaje cargado positivamente a pH 6,0 | 12,8 | | 13,7 | |
| Porcentaje cargado negativamente a pH 6,0 | 24,7 | | 23,0 | |

a Incluye el ácido + la amida
b Determinado como ácido cisteico después de la oxidación con ácido perfórmico.
c Determinado espectrofotométricamente a 280 nm.

lipoproteína de 20.000 Daltons que se encuentra dentro de un grupo denominado por Fichera y Brenner [9, 10] VHDL-I. Esta apolipoproteína no se asocia a la lipoforina [30]. Sobre esta lipoproteína del *T. infestans* volveremos más adelante.

Ryan [31], Ryan y col. [32] y Blacklock y Ryan [33] han publicado un trabajo y recopilaciones referentes al mecanismo de transporte de los diacilgliceroles por las lipoforinas en los insectos voladores *Manduca sexta* y *Locusta migratoria* en los cuales juega un papel fundamental la apolipoforina III (Apo-Lp III).

El comienzo del vuelo en los insectos adultos que requieren lípidos como combustible para el mismo inicia la movilización de los depósitos grasos del cuerpo graso. Durante los primeros 30 min. de vuelo se usan los hidratos de carbono como fuente de energía [34]. A partir de entonces el insecto recurre a los lípidos. La movilización de los depósitos grasos es inducida por la liberación de un péptido, la hormona adipokinética (AKH) del corpus cardiacum [35]. Esta hormona se une a un receptor del cuerpo graso acoplado a su vez a una adenilato ciclasa que induce la conversión del ATP a cAMP. Este AMP cíclico activa a una lipasa que hidroliza a los triacilgliceroles del cuerpo graso en diacilgliceroles. Los diacilgliceroles son transferidos a la lipoforina de alta densidad HDLp, proceso que es facilitado por unas partículas transferidoras de lípidos (LTP) [36]. La incorporación de los diacilgliceroles a la HDLp se realiza conjuntamente con las moléculas de Apo-Lp III. Ello conduce a una modificación de la lipoforina que aumenta de tamaño y disminuye una densidad convirtiéndose en una lipoforina de baja densidad (LDLp) (Fig. 2). Esta lipoforina en *Manduca sexta* y *Locusta migratoria* contiene de 16 a 28 molécu-

**TABLA 5**
**Composición de dos aminoácidos de la apolipoproteína de 16000 D de la lipoproteína de 1,19 g/ml de *T. infestans*.**

| *Aminoácido* | *Residuos p/mol* | *%mol* |
|---|---|---|
| Acido aspártico[a] | 17 | 14,4 |
| Treonina | 17 | 12,4 |
| Acido glutámico[a] | 14 | 12,7 |
| Serina | 6 | 3,7 |
| Prolina | 2 | 1,7 |
| Glicina | 13 | 6,0 |
| Alanina | 10 | 5,7 |
| Valina | 10 | 7,5 |
| Metionina | 0 | 0 |
| Isoleucina | 4 | 3,6 |
| Leucina | 12 | 10,2 |
| Tirosina | 5 | 6,0 |
| Fenilalanina | 4 | 4,3 |
| Histidina | 0 | 0 |
| Lisina | 7 | 6,4 |
| Arginina | 5 | |
| Cisteína | 0 | 0 |
| Triptofano | ND | |

a Incluye el ácido + la amida.
ND No determinado.

las de Apo-Lp III [37, 40] y tiene una mayor capacidad para transportar diacilgliceroles del cuerpo graso a los músculos de las alas. En estos músculos la lipoforina lipasa hidroliza los diacilgliceroles en ácidos grasos que son captados por los músculos de vuelo. Una "fatty acid binding protein" (FABP) estaría involucrada en la captación y transporte de esos ácidos grasos a los músculos [41]. A medida que los diacilgliceroles son removidos de la LDLp, las Apo-Lp III se disocian y se regenera la HDLp. Esta lipoforina de alta densidad vuelve al cuerpo graso donde se carga nuevamente de diacilgliceroles y Apo-Lp III repitiéndose el ciclo.

En consecuencia en los insectos voladores habrían por lo menos dos lipoforinas con diferente contenido de lípidos, la HDLp y la LDLp, que tienen la misma estructura apoproteica salvo por el contenido de Apo-Lp III que aparece en la LDLp.

Sin embargo, es necesario señalar que Ryan y col. [32] han reconocido además de la HDLp, tres otras subespecies de lipoforinas en la hemolinfa y oocitos de la *Manduca sexta* que deno-

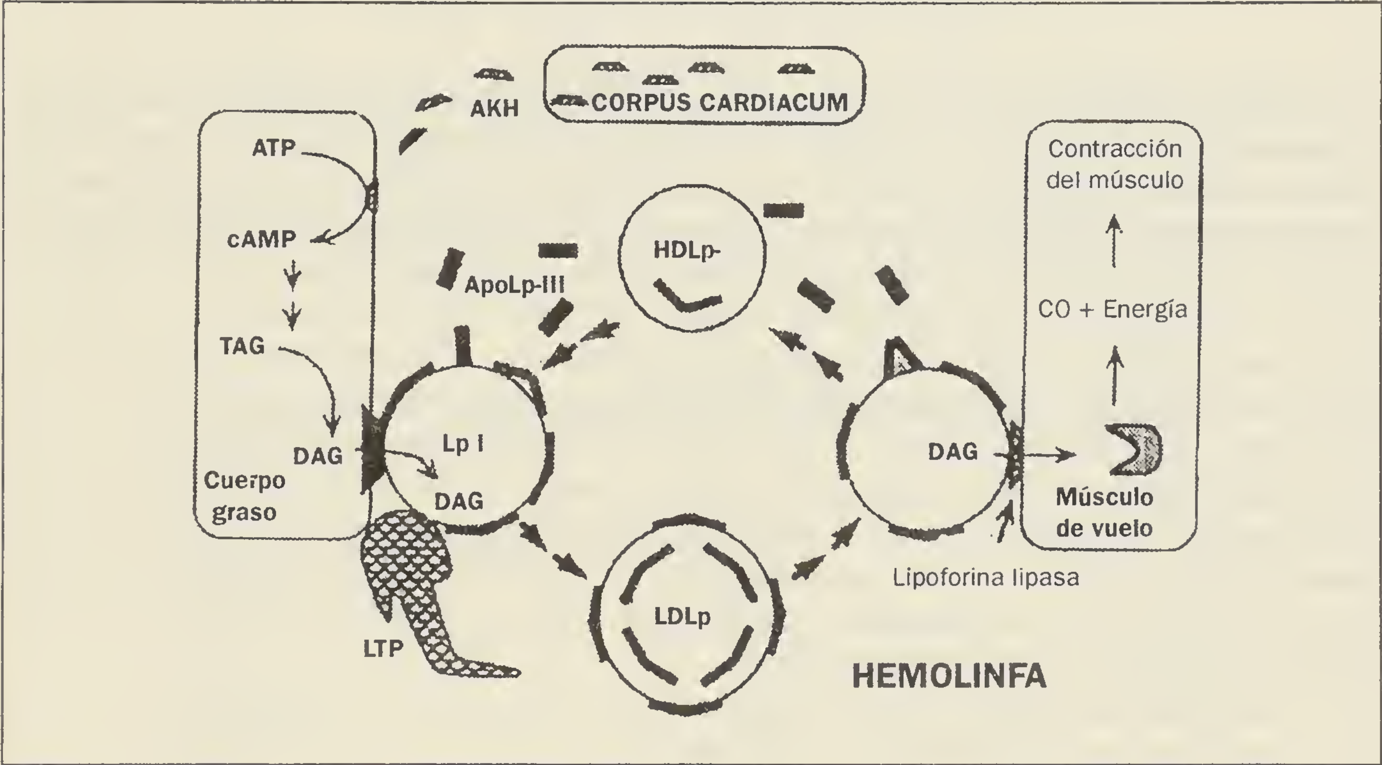



**Figura 2:** Modelo de movilización y transporte de diacilgliceroles por la lipoforina en insectos voladores. AKH hormona adipokinética; DAG diacilglicerol; Lpl lipoforina intermedia de carga; LTP partícula transferidora de lípido; EFA ácido graso libre; FABP "fatty acid binding protein", de Bladlock y Ryan [33] con permiso.

| | HDLpA | HDLpW 1 | HDLpW 2 | VHDpE |
|---|---|---|---|---|
| Origen | Adulto | Larva | Larva | Huevos |
| Densidad g/ml | 1.076 | 1.128 | 1.177 | 1.238 |
| % Diacil glicerol | 25 | 20 | 12.5 | 4 |
| Forma | | | | |

**Figura 3:** Subespecies de lipoforina de *Manduca sexta*.

minaron HDLpW1, HDLpW2 y VHDLpE (de oocitos). Dichas lipoforinas se diferencian en una disminución del contenido de lípidos con aumento de la densidad y en la forma (Fig. 3). Mientras la HDLp observada al microscopio electrónico es esferoidal, la HDLpW1 presenta una hendidura en un extremo, la HDLpW2 presenta una mayor y más profunda hendidura en un extremo y la VHDLpE presenta ya una estructura de media luna. Todas estas tres subespecies de lipoforina están constituidas por las apoproteínas Apo-Lp I y Apo-Lp II. La existencia de estas subespecies de lipoforina explicaría cómo se adapta la estructura de la lipoforina para el transporte de lípidos.

Hasta el momento estas formas de lipoforinas no han sido detectadas en el *T. infestans* cuya bien identificada estructura es la de la HDLp.

## LIPOPROTEINA DEL *T. INFESTANS* DE PESO MOLECULAR 20.000

Fichera y Brenner [9, 10] en un trabajo pionero preliminar señalaron que la ultracentrifugación en gradiente de densidad de la hemolinfa de insectos permitía separar un pico lipoproteico de densidad aproximada de 1,21 g/ml tal como fue señalado en página 3 y que fue denominado provisoriamente VHDL-I. Este producto así separado era indudablemente impuro y Rimoldi en nuestro laboratorio pudo purificarlo por cromatografía de permeación en un gel de Superdex HR y cromatografía de intercambio iónico (Mono-QHR) [30]. El peso molecular de esta lipoproteína fue de 20.000 y de ella se pudo aislar por electroforesis en gel de poliacrilamida una apoproteína pura de peso molecular 16.000. Se le analizó la composición de los aminoácidos constituyentes (Tabla 5) y la secuencia de los 20 aminoácidos del extremo terminal (Fig. 4). Esta apoproteína aparentemente no tiene una estructura común con la Apo-III de otros insectos. Por otra parte está asociada con un 6% de lípidos constituyendo la lipoproteína de 20.000 D. En la composición de los lípidos señala un predominio de hidrocarburos (66% del total) y la casi ausencia de fosfolípidos. Los diacilgliceroles, ácidos grasos libres y triacilgliceroles están en cantidades equivalentes de más o menos el 11%.

Un estudio inmunológico demostró que esta pequeña apoproteína de 16.000 Daltons no está asociada con otras lipoproteínas del *T. infestans*.

## LIPOPROTEINA HEMOLINFATICA DE MUY ALTA DENSIDAD (VHDL) DEL *T. INFESTANS*

La tercer lipoproteína VHDL-II reconocida por Fichera y Brenner [9, 10] en la hemolinfa del *T. infestans* machos y hembras fue cuidadosamente aislada y purificada por Rimoldi y col. [42] por doble ultracentrifugación con gradiente de densidad y denominada entonces simplemente lipoproteína de muy alta densidad (VHDL). El contenido de VHDL en la hemolinfa de machos adultos es de 8 mg de proteína/ml pero varía mucho como veremos luego. También se la en-

**Y T G G V P Y Y L Q Q Q T T T D D L X G**

**Figura 4:** Secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la apoproteína de la lipoproteína hemolinfática de 20.000 D y 1,19 g/ml de densidad del *T. infestans*.

cuentra en ninfas de 5° estadío [43, 44]. Su peso molecular es de 450.000 y está constituido por 6 unidades de una apolipoproteína de peso molecular 77.000. En consecuencia la lipoproteína es hexamérica.

Se analizó la composición de los aminoácidos (Tabla 6) y se demostró un predominio de ácido aspártico y aminoácidos aromáticos. Además la apoproteína está glicosilada.

La VHDL de *T. infestans* contiene 3% de lípidos. La composición de esos lípidos está detallada en Tabla 7 y demuestra una alta proporción de lípidos polares (fosfolípidos) y un llamativo alto contenido de ácidos grasos libres (25%). El contenido de diacilgliceroles, triacilgliceroles, hidrocarburos y ésteres del colesterol es bajo. La composición de los ácidos grasos libres está recopilada en la Tabla 8 y se la compara con la de los diacilgliceroles. Se observa que los principales componentes de ambos son los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico que predominan sobre los monoetilénicos, principal ácido el oleico. Es necesario destacar que contienen una no despreciable cantidad de ácidos linoleico y sobre todo araquidónico que deben provenir de la ingesta.

El alto contenido de ácidos grasos libres encontrado en la VHDL de *T. infestans* llevó a Soulages y col. [45] a postular que el transporte energético en la hemolinfa del *T. infestans* no se realiza solamente con diacilgliceroles (2.8 mg/ml) por la lipoforina sino también con ácidos grasos libres (0.31 mg/ml) por la misma lipoforina y por la VHDL. Dichos autores observaron que si bien la masa de diacilgliceroles en la hemolinfa total es mayor que la de ácidos grasos libres,

**TABLA 6**
**Composición de aminoácidos de la apoproteína VHDL del *T. infestans***

| *Aminoácido* | *Mol %* | *Residuos/mol* |
|---|---|---|
| Aspartato[a] | 14,2 | 89 |
| Treonina | 4,3 | 27 |
| Serina | 4,2 | 26 |
| Glutamatoa | 9,9 | 62 |
| Prolina | 4,9 | 31 |
| Glicina | 6,2 | 39 |
| Alanina | 5,6 | 36 |
| Valina | 7,7 | 48 |
| Metionina | 0,2 | 1 |
| Isoleucina | 3,3 | 21 |
| Leucina | 9,5 | 59 |
| Tirosina | 7,1 | 44 |
| Fenilalanina | 7,0 | 44 |
| Histidina | 2,4 | 15 |
| Lisina | 7,0 | 44 |
| Arginina | 5,4 | 34 |
| Cisteína[b] | 1,0 | 6 |
| Triptofano | n.d. | n.d. |
| Total | 99,9 | 625 |

a Incluye el ácido + la amida.
b Determinado comó ácido cisteico luego de la oxidación con ácido perfórmico.
n.d. no determinado.

la vida media de los ácidos grasos libres de dicha hemolinfa es sólo de 4 min. A su vez calculada la incorporación relativa de ácidos grasos y diacilgliceroles hallaron que ésta era 3, 4 veces mayor para los ácidos grasos libres. En consecuencia, los ácidos grasos libres hemolinfáticos del *T. infestans* realizan un transporte rapidísimo de energía a los tejidos destinatarios.

Es evidente que la lipoforina es el principal transportador de diacilgliceroles de la hemolinfa del *T. infestans* pero según González y col. [46] existiría un camino alternativo en el *T. infestans* de transporte de energía por medio de ácidos grasos libres. Estos autores estudiaron a su vez, especialmente la transferencia recíproca de ácidos grasos libres radiactivos incorporados a

**TABLA 7**
**Composición de los lípidos de la VHDL de *T. infestans*.**

| *Fracciones lipídicas* | *%* |
|---|---|
| Lípidas polares | 59,0 ± 3,5 |
| Acidos grasos libres | 24,9 ± 1,5 |
| Diacilgliceroles | 5,5 ± 0,9 |
| Triacilgliceroles | 3,7 ± 0,6 |
| Colesterol | Trazas |
| Esteres de colesterol | 2,3 ± 0,2 |
| Hidrocarburos | 4,6 ± 0,8 |

Los valores son el promedio ± DS (n = 3).

**TABLA 8**
**Composición de los ácidos grasos libres y diacilgliceroles de la VHDL de *T. infestans*.**

| | VHDL | |
|---|---|---|
| *Acido graso* | *Ac. grasos libres* | *Diacilgliceroles* |
| 14:0 | 6,7 ± 0,5 | 7,3 ± 0,6 |
| 16:0 | 39,0 ± 1,7 | 34,4 ± 1,5 |
| 16:1 | 6,5 ± 0,5 | 11,6 ± 0,8 |
| 18:0 | 19,1 ± 0,9 | 13,8 ± 0,8 |
| 18:1 | 10,0 ± 0,7 | 14,2 ± 0,6 |
| 18:2 | 6,6 ± 0,7 | 6,0 ± 0,5 |
| 20:3 | 4,3 ± 0,4 | 5,6 ± 0,4 |
| 20:4 (n-6) | 7,8 ± 0,8 | 7,1 ± 0,5 |
| Total saturados | 64,8 | 55,5 |
| Total insaturados | 16,5 | 25,8 |
| Total poliinsat. | 18,7 | 25,8 |

Los resultados son el promedio de cuatro muestras ± DS y están expresados como porcentajes del total de ácidos grasos.

los lípidos de la lipoforina y la VHDL. Encontraron que la VHDL era preferentemente un aceptor de ácidos grasos libres de la HDLp que un dador a la HDLp. Además, el ácido palmítico $^{14}C$ incorporado a VHDL era fácilmente cedido a cuerpo graso donde se transformaba en triacilgliceroles y a testículo donde se convertía en fosfolípidos en tiempos cortos y en triacilgliceroles en tiempos largos.

Soulages y Wells [47] recientemente han sugerido también que en determinadas circunstancias del transporte de ácidos libres puede llegar a ser importante en la hemolinfa de los insectos tales como *Manduca sexta.*

Con respecto a la VHDL de *T. infestans* es necesario indicar que desde hace cierto tiempo viene señalándose la existencia de una familia de proteínas hemolinfáticas de insectos con un peso molecular nativo alrededor de 500.000 formada por 6 subunidades homólogas de entre 70.000 y 85.000 Daltons que han sido denominados "hexámeros de depósito" (storage hexamers) o "hexamerinas" [48]. Estas proteínas hemolinfáticas adquieren gran concentración en el período larval y en ninfas previo a la metamorfosis y de ahí deriva el nombre hexamerina de depósito. Durante la metamorfosis desaparecen en la mayoría de los insectos y no se las encuentra generalmente en individuos adultos. Muchas de ellas son muy ricas en los aminoácidos aromáticos, tirosina y fenilalanina (más del 15%) y metionina (más del 4%) y han sido denominadas "arilforinas" [49].

La VHDL de *T. infestans* por su peso molecular y estructura hexamérica de unidades de 77.000 daltons se ubicaría dentro de los "hexámeros de depósito" y probablemente acumule aminoácidos para la metamorfosis de las ninfas de 5° estadío dado que aumenta en alta proporción en dicho estadío [43]. Sin embargo también se la encuentra en adultos donde se incrementa con el tiempo y demostraría tener además otra función. Dado que nuestra VHDL también transporta lípidos y especialmente ácidos grasos libres, esa podría ser la otra función que además la diferencia según los resultados actuales de los típicos "hexámeros de depósito" de otros insec-

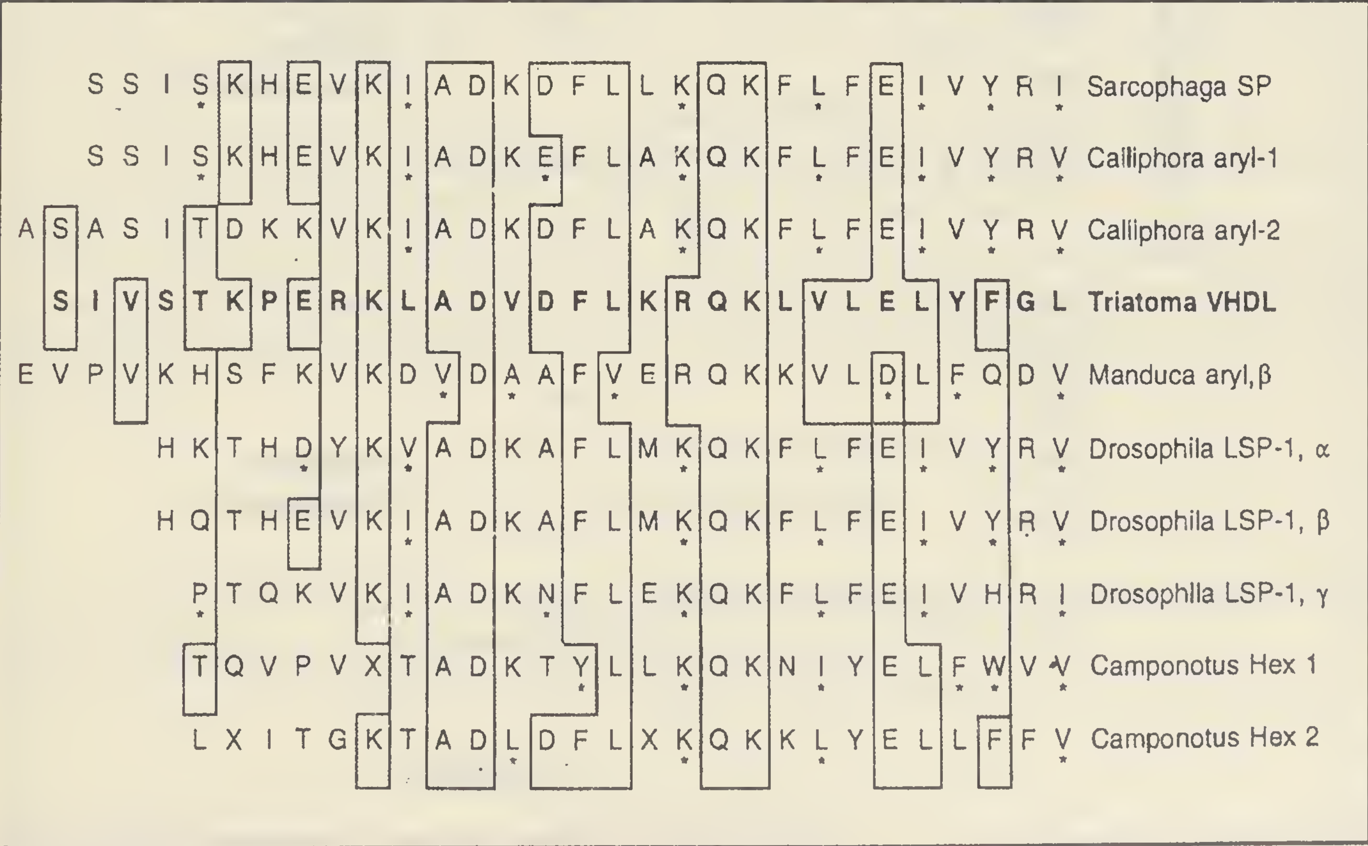



**Figura 5:** Alineamiento de la secuencia N-terminal de la VLDL de *T. infestans* comparada con los "hexámeros de depósito" de *S. peregrina, C. vicina, M. sexta, D. melanogaster* y *C. festinatus.* Los residuos idénticos de *T. infestans* y otras especies fueron recuadrados. Las substituciones conservativas se señalan con un asterisco.

tos. Es necesario señalar que recientemente en Brasil [50] se encontró que en *Rhodnius prolixus*, otro hemíptero, vector también de la enfermedad de Chagas posee un "hexámero de depósito" no "arilforina" que se encuentra también presente en insectos adultos.

El contenido de aminoácidos aromáticos de la VHDL de *T. infestans* no pasa del 14% y tiene sólo 0,2% de metionina con lo cual no quedaría perfectamente englobada dentro de las "arilforinas".

La secuencia de aminoácidos correspondiente al extremo N-terminal de la VHDL de *T. infestans* fue determinada [44] y comparada con las hexamerinas de otros insectos (Fig. 5). tal como puede verse en la figura algunas similitudes secuenciales se hallaron entre la VHDL de *T.*

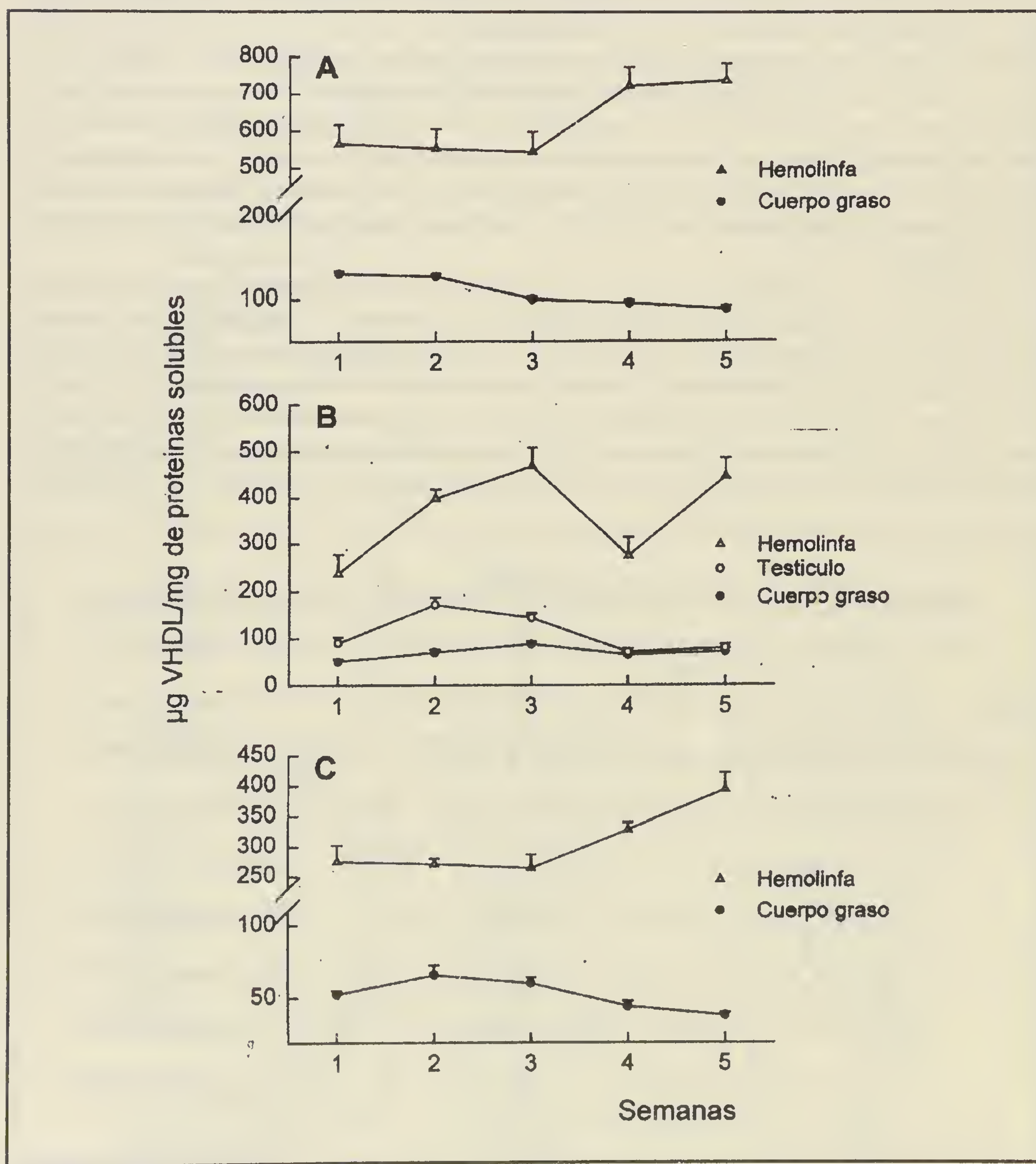



**Figura 6:** Títulos de VHDL determinados por ELISA en hemolinfa (Δ), cuerpo graso (•) y testículos (○). (A) durante el 5º estadío ninfal hasta su muda, (B) durante el estado adulto de machos, (C) durante el estado adulto de hembras. Las muestras de B y C de adultos fueron recolectadas desde la emergencia de ese estadío.

*infestans* y las hexamerinas de depósito de los Dípteros *Drosophila melanogaster, Sarcophaga peregrina* y *Calliphora vicina;* Himenópteros *Componotus festinatus* y Lepidópteros *Man-duca sexta.* Los residuos de aminoácidos del mismo tipo (ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina y asparagina; lisina, arginina e histidina; fenilalanina, tirosina y triptofano; alanina, leucina, isoleucina y valina; serina, treonina, prolina y glicina) son considerados como substituyentes conservativos y similares en sus propiedades. De acuerdo con la alineación el mayor grado de homología encontrada para la VHDL de *T. infestans* se produce con la Sarcophaga SP (37% de identidad y 60% de las posiciones ocupadas por idénticos residuos o similares). Valores y homologías similares se observan para la arilforina 2 de Calliphora y hexamerina 2 de Componotus. Por otra parte la secuencia de la VHDL tiene una identidad del 23-33% y similitud de residuos del 47-57% con las otras restantes "hexamerinas de depósito". Todo ello indica que la VHDL de *T. infestans* pertenece a esta gran familia de proteínas de insectos.

Por último es necesario señalar que Rimoldi y col. [43] usando un método de inmuno identificación (ELISA) pudieron hallar la lipoproteína VHDL de *T. infestans* en cuerpo graso y hemolina de ninfas e insectos adultos y también en la fracción soluble en buffer de homogenatos de testículos y huevos (Fig. 6). La VHDL hemolinfática alcanza un valor máximo poco antes de la muda de la ninfa en 5° estadío. Declina abruptamente justo después de la emergencia, pero aumenta nuevamente durante el período adulto. La VHDL de cuerpo graso decrece constantemente por el contrario durante todo el período de crecimiento de las ninfas, y vuelve a crecer poco y lentamente tanto en machos como en hembras adultos. La VHDL de testículos sufre un ciclo similar al observado en el cuerpo graso de machos adultos.

Es importante señalar que la demostración cabal que la VHDL del *T. infestans* es biosintetizada fundamentalmente en el cuerpo graso de los insectos adultos y del 5° estadío ninfal fue realizada por Rimoldi y col. [51]. Esa comprobación se hizo incubando *in vitro* el cuerpo graso con $^3$H leucina y precipitando luego el medio de incubación con antisueros específicos para VHDL. Además, la centrifugación del medio de incubación en un gradiente de densidad permitió separar una fracción radiactiva de densidad 1,27 g/ml que corresponde a la VHDL circulante de hemolinfa.

Es interesante agregar que también se halló biosíntesis de "hexámeros de depósito" en el cuerpo graso y testículo del *Rhodnius prolixus* [52] especie afín al *T. infestans*, confirmándose lo hallado en este último insecto.

En conclusión de lo antes dicho, resulta evidente que la hemolinfa del *Triatoma infestans* (vinchuca) macho transporta sus lípidos por medio de tres lipoproteínas bien caracterizadas que, si bien presentan gran similitud con las de otros insectos, tienen algunas propiedades diferentes.

## AGRADECIMIENTO

El autor agradece el apoyo económico brindado por CONICET y CIC de la Pcia. de Buenos Aires de Argentina y de la Firma EFAMOL de Canadá.

## REFERENCIAS

1. G. L. MILLS, P. A. LANE Y P. K. WEECH. *A guide book to lipoprotein technique,* Elsevier, Amsterdam, 1984, p. 8.
2. H. CHINO Y L. I. GILBERT, *Science* 143 (1964) 359.
3. H. CHINO Y L. I. GILBERT, Biochim. Biophys. Acta 98 (1965) 94.

4. A. TIETZ, Eur. J. Biochem. 2 (1967) 236.
5. H. CHINO, S. MURAKAMI Y K. HARASHIMA, Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 1.
6. K. K. THOMAS Y L. I. GILBERT, Arch. Biochem. Biophys. 127 (1968) 512.
7. H. CHINO, R. G. H. DOWNER, G. R. WYATT Y L. I. GILBERT, Insect Biochem. 11 (1984) 491.
8. R. R. BRENNER Y A. DE LA MERCED STOKA, Eds. *Chagas Disease Vectors,* CRC Press, Boca Raton, Florida, 1987, Vol I. to III.
9. L. E. FICHERA Y R. R. BRENNER, Comp. Biochem. Physiol. 72B (1982) 71.
10. L. E. FICHERA Y R. R. BRENNER, Acta physiol. latinoam. 32 (1982) 21.
11. L. E. FICHERA Y R. R. BRENNNER, Acta physiol. Latinoam. 36 (1986) 265.
12. O. J. RIMOLDI, J. L. SOULAGES, M. S. GONZÁLEZ, R. O. PELUFFO Y R. R. BRENNER, Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 40 (1990) 239.
13. S. MARGOLIS, J. Lipid Res. 8 (1967) 501.
14. C. M. LOCK Y D. J. VAN DER HORST, Biochim. Biophys. Acta 618 (1980) 80.
15. J. L. SOULAGES Y R. R. BRENNER, J. Lipid Res. 32 (1991) 407.
16. C. KATAGIRI, M. SATO, N. TANAKA, J. Biol. Chem. 262 (1987) 15857.
17. O. J. RIMOLDI, M. S. GONZÁLEZ, R. O. PELUFFO Y R. R. BRENNER, Comp. Biochem. Physiol. 90B (1988) 235.
18. M. A. TIERNO Y R. R. BRENNER, Acta physiol. latinoam. 29 (1979) 87.
19. M. A. TIERNO Y R. R. BRENNER, Acta physiol. latinoam. 30 (1980) 309.
20. P. JUÁREZ Y R. R. BRENNER, Comp. Biochem. Physiol. 93B (1989) 763.
21. R. R. BRENNER Y A. M. BERNASCONI, Comp. Biochem. Physiol. 87B (1987) 815.
22. R. R. BRENNER Y A. M. BERNASCONI, Comp. Biochem. Physiol. 93B (1989) 1.
23. O. J. RIMOLDI, R. O. PELUFFO, M. S. GONZÁLEZ Y R. R. BRENNER, Comp. Biochem. Physiol. 82B (1985) 187.
24. J. P. SHAPIRO, P. S. KEIM Y J. H. LAW, J. Biol. Chem. 259 (1984) 3680.
25. N. M. PATTNAIK, E. C. MUNDALL, B. G. TRAMBUSTI, J. M. LAW Y T. G. KEZDY, Comp. Biochem. Physiol. 63B (1979) 499.
26. L. S. ROBBS, R. O. RYAN, J. O. SCHMIDT, P. S. KEIM Y J. H. LAW, J. Lipid Res. 26 (1985) 241.
27. J. L. SOULAGES, O. J. RIMOLDI Y R. R. BRENNER, J. Lipid Res. 29 (1988) 172.
28. O. J. RIMOLDI, H. A. GARDA Y R. R. BRENNER, J. Lipid Res. 37 (1996) 2125.
29. R. O. RYAN, J. O. SCHMIDT Y J. H. LAW, Archs. Insect Biochem. Physiol. 1 (1984) 375.
30. G. S. FINARELLI, O. J. RIMOLDI Y R. R. BRENNER, VIII PABMB, Chile (1996).
31. R. O. Ryan, J. Lipid Res. 31 (1990) 1725.
32. R. O. RYAN, C. M. KAY, K. OIKAWA, H. LIU, R. BRADLEY Y D. G. SCRABA, J. Lipid Res. 33 (1992) 55.
33. B. J. BLACKLOCK Y R. O. RYAN, Insect Biochem. Molec. Biol. 24 (1994) 855.
34. A. M. TH. BEENAKKERS, D. J. VAN DER HORST Y W. J. A. VAN MARREWIJK, Insect Biochem. 144 (1984) 243.
35. A. M. TH. BEENAKKERS, R. E. B. BLOEMEN, T. A. DE VLIEGER, D. J. VAN DER HORST Y W. J. A. VAN MARREWIJK, Peptides 6 (1985) 437.
36. R. O. RYAN, S. V. PRASAD, E. J. HENRIKSEN, M. A. WELLS Y J. H. LAW, J. Biol. Chem. 261 (1986) 563.
37. M. A. WELLS, R. O. RYAN, J. K. KAWOOYA Y J. H. LAW, J. Biol. Chem. 262 (1987) 4172.
38. M. C. VAN HEUSDEN, D. J. VAN DER HORST, J. VOSHOL Y A. M. TH. BEENAKKERS, Insecta Biochem. 17 (1987) 771.
39. H. CHINO, R. G. H. DOWNER Y K. TAKAHASHI, J. Lipid Res. 27 (1986) 21.
40. D. J. VAN DER HORST, R. O. RYAN, M. C. VAN HEUSDEN, T. K. F. SCHULZS, J. M. VAN DOORN, J. H. LAW Y A. M. T. BEENAKKERS, J. Biol. Chem. 263 (1988) 2027.
41. N. HAUNERLAND Y J. M. CHISHOLM, Biochim. Biophys. Acta 1047 (1990) 233.

42. O. J. Rimoldi, J. L. Soulages, S. M. González, R. O. Peluffo y R. R. Brenner, J. Lipid Res. 30 (1989) 857.
43. M. S. González, J. L. Soulages y R. R. Brenner, Insect Biochem. 21 (1991) 679.
44. O. J. Rimoldi, B. Córsico, M. S. González y R. R. Brenner, Insect Biochem. Molec. Biol. 26 (1996) 705.
45. J. L. Soulages, O. J. Rimoldi, R. O. Peluffo y R. R. Brenner, Biochem. Biophys. Res. Commun. 157 (1988) 465.
46. M. S. González, O. J. Rimoldi y R. R. Brenner, Comp. Biochem. Physiol. 110B (1995) 767.
47. J. L. Soulages y M. A. Wells, Insect Biochem. 24 (1994) 79. N. H. Telfer y J. G. Kunkel, Annu. Rev. Entomol. 36 (1991) 205.
48. W. H. Telfer, P. Keim y J. Law, Insect Biochem. 13 (1983) 601.
49. K. G. Rehn y A. L. R. Rolim, Insect Biochem. 20 (1990) 195.
49. O. J. Rimoldi, M. S. González y R. R. Rrenner, Acta Physiol. Pharmacol. Terap. Latinoam. (en prensa).
50. F. S. Faría, E. S. García y S. Goldenberg, Insect Biochem. Molec. Biol. 24 (1994) 59.

# INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

## General

Los Anales de la Sociedad Científica Argentina es una revista multidisciplinaria que considera para su publicación trabajos o notas de investigación originales en cualquier área de la ciencia, así como trabajos de revisión y/o actualización, biografías, etc.

Se sugiere a los autores que lean las instrucciones antes de preparar los manuscritos.

Tres copias de los manuscritos deben ser enviadas al Editor, Anales de la Sociedad Científica Argentina, Avda. Santa Fe 1145, Capital Federal, (1059), Argentina.

Los autores serán notificados de inmediato de la recepción de sus manuscritos. Todos los trabajos son enviados a los revisores que asesoran científicamente al editor acerca de la aceptación o rechazo de las correspondientes publicaciones de los mismos. La decisión final respecto de la publicación o no de un trabajo es solamente responsabilidad del Editor.

El envío de un Manuscrito a los Anales implica que éste es un informe de un trabajo original de investigación que no ha sido publicado previamente ni que actualmente esté siendo considerado para su eventual publicación. En caso de ser aceptado para su impresión en los Anales, el trabajo no será publicado en la misma forma ni con alteraciones en otras publicaciones sin previo consentimiento del Editor.

El Editor se reserva el derecho de no aceptar aquellos manuscritos que por una diferencia y/o inadecuada preparación no se ajusten a las normas indicadas a continuación.

Los Anales de la Sociedad Científica Argentina constan de las siguientes secciones:

- Artículos de investigación
- Notas de investigación
- Artículos de revisión y/o actualización
- Cartas al Editor, biografías, etc.
- Anuncios de interés general.

## Manuscritos

Todos los manuscritos deberán ser preparados cuidadosamente en idioma castellano o inglés, comenzando cada sección en hojas separadas. Se recomienda prestar atención a la pulcritud del tipeado y sujetarse a la estructura habitual de las publicaciones primarias que consisten generalmente en:

1ra. Página: Título del Trabajo, listado de los autores, lugar y dirección del sitio donde se llevó a cabo la investigación y cuando corresponda persona y dirección a la cual se remitirá toda la información concerniente al manuscrito.

2da. Página: Resumen en idioma español y en idioma inglés de hasta 200 palabras.

En las páginas subsiguientes se incluirán las secciones Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Referencias. A continuación se agregarán las tablas con sus títulos, leyendas de las figuras y gráficos y finalmente las figuras y gráficos preparados como se indica más abajo.

El tipeado del manuscrito deberá hacerse a doble espacio en papel tamaño carta (aproximadamente 21cm. x 29 cm.), dejando 3 cm. de márgenes izquierdo, superior, e inferior, debiéndose numerar secuencialmente todas las páginas.

No se aceptará la inserción de notas de pie de página. Cuando ello sea necesario, se deberá incluir tales notas en el mismo texto.

Se recomienda emplear el Sistema Métrico decimal de medidas y las abreviaturas universales estándar. Sólo se permitirá el empleo del sistema Internacional de unidades para las medidas.

Como regla general no se deberá repetir la misma información en tablas, figuras y texto. Salvo en casos especiales que justifiquen alguna excepción se aceptará presentar esencialmente la misma información en dos formas simultáneas.

Cada sección se numerará consecutivamente, recomendándose no emplear subsecciones.

## Tablas

Las tablas deben prepararse en hojas aparte y a doble espacio. Las mismas incluirán un título suficientemente aclaratorio de su contenido y se indicará en el texto su ubicación, señalándolo con lápiz sobre el margen izquierdo.

Cada tabla se numerará consecutivamente con números arábigos. Sólo se deberá incluir en las tablas información significativa, debiéndose evitar todo dato accesorio y/o que pueda ser mejor informado en el mismo texto del trabajo.

Cada tabla se tipeará en hoja separada.

Los títulos de las filas y columnas deben ser lo suficientemente explícitos y consistentes, pero al mismo tiempo se recomienda concisión en su preparación.

**Ilustraciones**

Las ilustraciones (gráficos y fotografías) deberán ser de suficiente calidad tal que permitan una adecuada reproducción debiéndose tener en cuenta que la reproducción directa de los mismos conlleva una relación de reducción entre 1:2 y 1:3. Todas las ilustraciones se numerarán consecutivamente y en el reverso de las mismas se indicarán con lápiz blando el nombre de los autores, el número de la misma y cuando corresponde la orientación para su pertinente impresión.

Los títulos de las ilustraciones se tipearán en hoja aparte, debiéndose denotar el posicionado de las mismas en el texto por medio de una indicación con lápiz en el margen izquierdo.

Las dimensiones de las ilustraciones no deberán exceder las de las hojas del manuscrito y no se deberán doblar.

Los gráficos se dibujarán con tinta china sobre papel vegetal de buena calidad y por los mismos medios se incluirán los símbolos, letras y números correspondientes. No se deberá tipear símbolo, letra o número alguno en los gráficos y fotografías.

Enviar un original y dos copias de cada ilustración. Las fotografías sólo se podrán enviar en blanco y negro, ya que no es posible imprimir fotografías en otros colores.

Cada ilustración se presentará en hoja separada.

**Referencias**

Los Anales adoptan el sistema de referencias por orden, el cual consiste en citar los trabajos en el orden que aparecen por medio de número cardinal correspondiente entre barras, e.g./1/. Los libros se indicarán en la lista de referencias dando el/los autor/es, título, edición, editorial, ciudad, año y página inicial. Para indicar capítulo de libro se añadirá a lo anterior el título del mismo y el nombre del editor.

El listado de referencias se tipeará en hoja separada y a doble espacio. Se recomienda especialmente a los autores emplear las abreviaturas estándar sugeridas por las propias fuentes.

Sólo se admitirán citas de publicaciones válidas y asequibles a los lectores por los medios normales debiéndose evitar recurrir a informes personales, tesis, monografías, trabajos en prensa, etc., de circulación restringida.

Lo que sigue son algunos ejemplos de indicar las citas bibliográficas en la lista de referencia:

*Públicación periódica:* A. M. Sierra y F. S. González, J. Chem. Phys. 63 (1977) 512.

*Libro:* R. A. Day, How to write and publish a Scientific paper, Second Edition, ISI Press, Philadelphia, 1983, p. 35.

*Capítulo de libro:* Z. Kaszab, Family Tenebrionidae en W. Wittmer and Buttiper (Eds.) Famma of Sandi Arabia, Ciba-Geigy, Basel, 1981, p. 3-15.

*Conferencia o Simposio*: A. Ernest, Energy conservation measures in Kuwaiti buildings. Proccedings of the First Symposium on Thermal Insulation in the Gulf States, Kuwait Institute for Scientific Research, Kuwait, 1975, p. 151.

Se recomienda revisar cuidadosamente las citas en el texto y la lista de referencias a los efectos de evitar inconsistencias y/u omisiones.

*Pruebas:* Todo artículo deberá ser revisado en la forma de prueba de galera por el autor indicado en la carta de presentación del trabajo, la cual se devolverá debidamente corregida a las 72 horas de recibida a la Redacción de los Anales. No se admitirá en forma alguna alteración substancial del texto y en caso imprescindible se procederá a la inclusión al final del trabajo de lo que correspondiera bajo el título de "Nota agregada en la prueba".

Impreso en los talleres gráficos de la
Cooperativa Gráfica Belgrano
Aristóbulo del Valle 1942 • Capital Federal.